

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CINTIA REGINA FELIX DE OLIVEIRA

MICROBIOTA DAS VIAS AÉREAS DE PACIENTES PEDIÁTRICOS COM
FIBROSE CÍSTICA

CURITIBA

2014

CINTIA REGINA FELIX DE OLIVEIRA

MICROBIOTA DAS VIAS AÉREAS DE PACIENTES PEDIÁTRICOS COM
FIBROSE CÍSTICA

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Medicina Interna, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Nelson A. Rosário Filho

Co-orientador: Prof. Dra. Lilian Pereira Ferrari

CURITIBA

2014

Oliveira, Cintia Regina Felix de
Microbiota das vias aéreas de pacientes pediátricos com fibrose cística / Cintia Regina
Felix de Oliveira. -- Curitiba, 2014.
108 f.; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Nelson Augusto Rosário Filho
Co-orientador: Prof.^a Dr.^a Lilian Pereira Ferrari

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna. Setor
de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

1. Fibrose Cística. 2. Epidemiologia. 3. Microbiologia. I. Rosário Filho, Nelson
Augusto. II. Título.

NLM WA 105



Ministério da Educação
Universidade Federal do Paraná
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA INTERNA
= MESTRADO e DOUTORADO =

PARECER

Aos seis dias do mês de junho do ano de dois mil e quatorze, a banca examinadora constituída pelos Professores Doutores: **Carlos Antonio Riedi, Lilian Pereira-Ferrari e Helena Aguilar Peres Homem de Mello de Souza**, exarou o presente parecer sobre a dissertação elaborada por **Cintia Regina Felix de Oliveira**, do **Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna** nível Mestrado, da **Universidade Federal do Paraná**, intitulada: “**MICROBIOTA DAS VIAS AÉREAS DE PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA**”. A Banca examinadora considerou que **Cintia Regina Felix de Oliveira**, apresentou trabalho adequado para dissertação e o defendeu com segurança e propriedade nas arguições que lhe foram feitas, de modo a merecer a sua **aprovação**, sendo recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de **Mestre em Medicina Interna** e a publicação de artigo em revista técnico-científica com corpo editorial, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das arguições, cumpridas outras exigências previstas em normativas da pós-graduação.

Curitiba, 06 de junho de 2.014.

Professor Dr. **Carlos Antonio Riedi**

Professora Dra. **Lilian Pereira-Ferrari**

Professora Dra. **Helena Aguilar Peres Homem de Mello de Souza**

A DEUS autor da minha vida!

Aos meus amores, Alessandro, Isabella,

Henrique,

Aos meus queridos e amados pais Joaquim e Zilda,

Se não fossem TODOS vocês eu não teria conseguido!

AGRADECIMENTOS

A DEUS por sua presença em minha vida em todos os momentos desta longa caminhada, pelo presente de poder realizar um sonho.

Ao meu amor Alessandro de Oliveira, por todo apoio, dedicação, paciência, carinho e por simplesmente fazer parte de mim.

Aos meus amados filhos Isabella e Henrique por entenderem todos os momentos de ausência para trabalhar na construção deste trabalho, momentos de cansaço e ansiedade, e por me alegrarem com simples gestos de amor e carinho.

Aos meus queridos e amados pais, Joaquim Felix Neto e Zilda Silvério Felix por tudo que sou, por todo apoio e amor incondicional, pela construção do meu passado para que fosse possível viver o presente.

A minha querida amiga co-orientadora Professora Doutora Lilian P. Ferrari por todo apoio, dedicação, carinho, paciência, amizade e por ser um presente de Deus na minha vida.

Ao meu querido orientador Professor Doutor Nelson A. Rosário pela paciência e por dedicar uma parte do seu precioso tempo com o meu trabalho.

Ao Professor Doutor Carlos A. Riedi, por estar sempre auxiliando e compartilhando as conquistas do trabalho.

A minha amiga, Professora Danieli Isabel R. Ribas por seu apoio, carinho, amizade, desde o dia em que nos conhecemos até hoje sempre pronta para me ajudar, para dar uma palavra de incentivo, e até mesmo um empurrão quando achei que não seria possível.

A Professora Doutora Ana T. B. Guimarães que foi simplesmente um presente de Deus na minha vida, uma pessoa maravilhosa, competente, extremamente profissional que me socorreu em um momento muito difícil.

A Professora Doutora Vanda Cristina Galvão Pereira, pelo apoio, incentivo, compreensão em todos os momentos.

As Professoras Jannaína Vasco, Liya Mikami, a egressa e colega Cleonice Garbuio Bortoli, a todos os alunos da biomedicina da Unibrasil em especial a Jessica Oliveira Santos e a Aniele C. Ribas Leão que me auxiliaram das mais variadas formas, muito obrigada a todas.

A minha querida tia e irmã Nil pelas orações, palavras de incentivo, carinho, apoio e por ser uma pessoa maravilhosa.

Ao meu irmão Sidnei que mesmo a distância sempre torceu por mim. Aos meus sobrinhos Edney, Isaac, Melissa por serem joias em minha vida.

A minha querida tia Jovelina pelo apoio e orações em todos os momentos.

A todos os meus familiares, sogros Francisco de Oliveira e Aparecida Gavioli, que me ajudaram orando por mim e torcendo para que fosse possível realizar este sonho.

A todos os amigos que de alguma forma torceram, oraram, e apoiaram.

A todos, MUITO OBRIGADA!!!!

RESUMO

A doença pulmonar é um componente importante na Fibrose Cística (FC), pois a maioria dos pacientes vai á óbito devido este quadro ocasionado por infecções bacterianas, e pelo diagnóstico tardio na maioria dos centros de atendimento da FC. Os objetivos do trabalho foram verificar a microbiota das vias aéreas de pacientes com FC do Estado do Paraná, triados e acompanhados pelo ambulatório de FC do Hospital de Clínicas -UFPR (HC) no ultimo quinquênio (2008-2012). Para fins de análise os pacientes foram organizados da seguinte forma: grupo 1: pacientes acompanhados a partir de 2 anos de idade e grupo 2: pacientes acompanhados desde o 1º mês de idade. A pesquisa foi um estudo retrospectivo de análise de dados registrados no sistema informatizado do HC e acessados através do serviço de Alergia, Imunologia e Pneumologia, com 83 pacientes, visando acompanhar a evolução das colonizações do trato respiratório nos primeiros anos de vida. Durante a pesquisa foi realizada a busca de informações referentes ao número de culturas: realizadas, positivas, negativas durante 5 anos. Os resultados apontaram que o tempo de inclusão no programa foi em média 2 meses, semelhante aos dados da *Cystic Fibrosis Foundation*. *S. aureus* foi o primeiro patógeno isolado, a média de idade de 1,5 anos e apresentou a maior ocorrência por paciente (47%), a colonização por MRSA foi menor que a observada na literatura (7,7% no grupo 1 e 7% no grupo 2). A prevalência do complexo *Burkholderia cepacia* (cBc) nas crianças a partir de 1 mês de idade foi em torno de 10%, houve aumento do número de culturas positivas para os principais patógenos no 3º ano de acompanhamento com posterior queda no 5º ano nos 2 grupos, mas com comportamento das colonizações semelhante entre grupos. Foi também observado relação inversa entre a frequência de culturas positivas para fungos em relação à frequência dos principais patógenos, sugerindo efeito inibidor da *P. aeruginosa* em relação à colonização por fungos. Embora tenha sido observada alta taxa de colonização pelos principais patógenos, ao final do 5º ano de acompanhamento houve diminuição das colonizações, possivelmente decorrente do tratamento. Os dados observados corroboram com a literatura que atribui a estratégia de triagem neonatal à possibilidade de diagnóstico e tratamento precoces das colonizações sugerindo ser esta a única forma de prolongar a sobrevivência ao paciente com qualidade de vida.

Palavras- chave: Fibrose cística, epidemiologia, microbiologia

ABSTRACT

Respiratory tract disease is an important component in Cystic Fibrosis (CF), since the vast majority of patients died due to pulmonary disease caused by bacterial infections, and due to a late diagnosis in most CF medical centers. The aim of this research were to verify the microorganism colonization of the airways of CF patients from Paraná state, screened and monitored by CF ambulatory, HC- UFPR, in the last five-year period (2008-2012). For purposes of analysis, patients were divided as follows: group 1: patients followed since 2 years old and group 2: patients followed since the first month of age. The study was an observational retrospective cohort study of 83 patients, to monitor the progress of colonization of the respiratory tract early in life, through a survey done in the database of Allergy, Immunology, Pulmonology from HC service from HC. Information regarding the number of cultures was obtained and if they were positive or negative in the last 5 years. The results showed that the time of inclusion in the program was on average 2 months, similar to data from the Cystic Fibrosis Foundation. The *S. aureus* was first isolated pathogen, at the mean age of 1.5 years and had the highest incidence per patient (47%) colonization with MRSA was lower than that observed in the literature (7.7% in group 1 and 7% in group 2). The prevalence of the *complex of Burkholderia cepacia* (cBc) in children from 1 month of age was around 10%, there was an increase in the number of positive cultures for the pathogens in the 3rd year of follow up with further decrease in the 5th year in both groups , but with the behavior of colorization similar between the groups. It was also observed an inverse relationship between the frequency of positive cultures for fungi and yeasts in the frequency of the main pathogens, suggesting an inhibitory effect of *P. aeruginosa* in relation to colonization by fungi and yeasts. Although high colonization rate was observed by major pathogens, at the end of the 5th year of follow-up there was a decrease of colonization, probably due to treatment. These data corroborate the literature that attributes to the neonatal screening the possibility of early diagnosis and treatment suggesting that this is the only way to prolong the survival of patients with quality of life.

Keywords: Cystic Fibrosis, Epidemiology, Microbiology

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - SINAIS E SINTOMAS DA FIBROSE CÍSTICA	22
QUADRO 2 - FATORES DE VIRULENCIA DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA	40

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – PASSOS DA CLONAGEM E LOCALIZAÇÃO DO GENE <i>CFTR</i> E DISTRIBUIÇÃO DOS ÉXONS DO GENE <i>CFTR</i>	32
FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PROTEÍNA CFTR	33
FIGURA 3 – FLUXOGRAMA DOS PACIENTES CADASTRADOS PELO AMBULATÓRIO DE FC DO HC-UFPR	60

LISTA DE GRÁFICO

GRÁFICO 1 – COLONIZAÇÕES RESPIRATÓRIAS X IDADE	56
GRÁFICO 2 – FREQUÊNCIA RELATIVA DE PACIENTES AVALIADOS E CADASTRADOS NO AMBULATORIO DE FC HC-UFPR (GRUPO 1).....	64
GRÁFICO 3 – FREQUÊNCIA RELATIVA DE PACIENTES AVALIADOS E CADASTRADOS NO AMBULATORIO DE FC HC-UFPR (GRUPO 2).....	65
GRÁFICO 4 – FREQUÊNCIA RELATIVA DE CULTURAS PARA cBc ENTRE PACIENTES ACOMPANHADOS NO LABORATÓRIO DE FC (GRUPO 1).....	67
GRÁFICO 5 – FREQUÊNCIA RELATIVA DE CULTURAS POSITIVAS DE FUNGOS E LEVEDURAS, <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>HAEMOPHILUS sp.</i> cBc EM FUNÇÃO DOS ANOS DE MONITORAMENTO ENTRE PACIENTES CADASTRADOS NO AMBULATÓRIO (GRUPO 1).....	68
GRÁFICO 6 – MÉDIAS E INTERVALOS DE CONFIANÇA DA PORCENTAGEM DE CULTURAS POSITIVAS PARA BACTÉRIAS PATOGÊNICAS EM RELAÇÃO AO TEMPO DE INCLUSÃO DO PROGRAMA DE FC DO HC-UFPR (GRUPO 1).....	71
GRÁFICO 7 – MÉDIAS E INTERVALOS DE CONFIANÇA DA PORCENTAGEM DE CULTURAS POSITIVAS PARA BACTÉRIAS PATOGÊNICAS EM RELAÇÃO AO TEMPO DE INCLUSÃO DO PROGRAMA DE FC DO HC-UFPR (GRUPO 2).....	72
GRÁFICO 8 – FREQUÊNCIA RELATIVA ACUMULADA DE CULTURAS POSITIVAS E NEGATIVAS DOS PACIENTES NASCIDOS ENTRE 2008/2009	73
GRÁFICO 9 PERCENTUAL DE CULTURAS POSITIVAS DOS PACIENTES ACOMPANHADOS DESDE O PRIMEIRO MÊS DE IDADE NASCIDOS ENTRE 2008/2009	74
GRÁFICO 10 – FREQUÊNCIAS RELATIVAS DE CULTURAS POSITIVAS PARA cBc ISOLADAS E ASSOCIADAS A OUTRAS BACTÉRIAS DOS 83 PACIENTES.....	76

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – INCIDÊNCIA DE FC NO SUL E SUDESTE DO BRASIL.....	31
TABELA 2 – CLASSES DE MUTAÇÕES NO GENE <i>CFTR</i>	34
TABELA 3 – OBJETIVOS GERAIS DO TRATAMENTO DA FC	54
TABELA 4 – CARACTERÍSTICAS DOS GRUPOS DE PACIENTES CONFORME TEMPO DE ACOMPANHAMENTO	63
TABELA 5 – CULTURAS REALIZADAS E CULTURAS POSITIVAS NO PERÍODO DE 2008/2012. MÉDIA \pm DP DE CULTURAS/PACIENTES EM FUNÇÃO DOS ANOS (GRUPO 1).....	66
TABELA 6 – CULTURAS REALIZADAS E CULTURAS POSITIVAS NO PERÍODO DE 2008/2012. MÉDIA \pm DP DE CULTURAS/PACIENTES EM FUNÇÃO DOS ANOS (GRUPO 2).....	66
TABELA 7 – PREVALÊNCIAS: FREQUÊNCIAS ABSOLUTAS E RELATIVAS DE OCORRÊNCIA DE CULTURAS REALIZADAS, CULTURAS POSITIVAS E CULTURAS POSITIVAS PARA FUNGOS E LEVEDURAS EM FUNÇÃO DOS ANOS DE MONITORAMENTO	69
TABELA 8 – FREQUÊNCIAS ABSOLUTAS E RELATIVAS DE OCORRÊNCIA DE BACTÉRIAS EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE CULTURAS POSITIVAS PARA BACTÉRIAS PATOGÊNICAS AO LONGO DOS ANOS DE MONITORAMENTO (GRUPO 1)	69
TABELA 9 – FREQUÊNCIAS ABSOLUTAS E RELATIVAS DE OCORRÊNCIA DE CULTURAS NEGATIVAS E POSITIVAS EM FUNÇÃO DOS ANOS DE ACOMPANHAMENTO (GRUPO 2).....	75

LISTA DE ABREVIATURAS

ABPA	- Aspergilose Broncopulmonar Alérgica
ATP	- adenosina trifosfato
CBC	- Complexo da Burkholderia cepacia
<i>CFTR</i>	- Gene que codifica para a proteína CFTR
CFTR	- Proteína reguladora de condutância transmembrânica
CFF	- Cystic Fibrosis Foundation
DNA	- Ácido Desoxirribonucleico
EUA	- Estados Unidos da América
FC	- Fibrose Cística
FLUTTER	- Oscilação oral de alta frequência
G552X	- mutação do gene da proteína CFTR
G551D	- mutação do gene da proteína CFTR
HC	- Hospital das Clínicas
HC-UFPR	- Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Paraná
Ig E	- Imunoglobulina E
LBA	-Lavado Bronco- alveolar
MRSA	- <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilicina
N1303K	-mutação do gene da proteína CFTR
PD	- diferença do potencial elétrico
PMN	-polimorfonucleares
RNA	- ácido ribonucleico
R533X	-mutação do gene da proteína CFTR
sp	- espécie
spp	- espécies
TIR	- tripsina imuno -reativa
UTI	- unidade de terapia intensiva
VEF1	-volume expiratório forçado no primeiro segundo
Δ F508	-mutação por deleção de fenilalanina na posição 508 da proteína

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3 REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 HISTÓRICO	19
3.2 DIAGNÓSTICO	21
3.2.1 Critérios diagnósticos	23
3.2.2 Dosagem de tripsina imunoreativa (TIR)	24
3.2.3 Teste do suor	25
3.2.4 Diferença do potencial nasal	26
3.2.5 Análise das mutações	26
3.2.6 Triagem neonatal	27
3.3 EPIDEMIOLOGIA DA FIBROSE CÍSTICA	29
3.4 GENÉTICA DA FIBROSE CÍSTICA	31
3.4.1 Mutações	33
3.5 MICROBIOLOGIA DA FIBROSE CÍSTICA	35
3.5.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	36
3.5.1.1 Fatores de virulência	38
3.5.1.2 Transmissão	38
3.5.2 <i>Haemophilus influenzae</i>	38
3.5.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39
3.5.3.1 Fatores de virulência	39
3.5.3.2 Patogenia	41
3.5.3.3 Fenótipo mucoide	42
3.5.3.4 Resposta imunológica	43
3.5.3.5 Transmissão	44
3.5.4 Complexo <i>Burkholderia Cepacea</i>	45
3.5.4.1 Transmissão e vias de aquisição	47
3.5.5 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	47
3.5.6 Micobactérias	47

3.5.7 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> e <i>Achromobacter Xylosoxidans</i>	48
3.5.8 Fungos	49
3.5.8.1 <i>Aspergillus fumigatus</i>	49
3.5.8.2 Leveduras.....	50
3.6 CULTURA	50
3.6.1 Coleta de amostras clínicas	51
3.6.2 Processamento das amostras para culturas	52
3.7 TRATAMENTO.....	53
3.7.1 Terapia de reposição enzimática.....	57
3.7.2 Fisioterapia.....	57
4 MATERIAS E MÉTODOS	59
4.1 CASUÍSTICA.....	59
4.2 MÉTODOS	61
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	62
5 RESULTADOS	63
6 DISCUSSÃO	77
7 CONCLUSÃO	87
REFERENCIAS	88
APÊNDICE	101
ANEXO	108

1 INTRODUÇÃO

A Fibrose Cística (FC) é uma doença genética autossômica recessiva, grave, hereditária, com diminuição de sobrevida, incidente principalmente em eurodescendentes, que apresenta como principal comprometimento a obstrução pulmonar crônica (RAMSEY *et al.*, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2002). Na sua forma típica, a doença é caracterizada pela tríade: doença pulmonar obstrutiva crônica, quadro de má absorção e alterações eletrolíticas do suor.

O gene responsável pela FC (*CFTR- cystic fibrosis conductance transmembrane regulator*) foi identificado em 1989 e desde então quase 2000 mutações e 200 polimorfismos foram identificados (ROMENS *et al.*, 1989; RIORDAN *et al.*, 1989; KEREN *et al.*, 1989; COOPER; KRAWCZAK, 1993 e MORRAL, 1994; BONADIA, 2014). O gene *CFTR* situa-se no braço longo do cromossomo 7q3.1, que codifica uma proteína de 1480 aminoácidos denominada CFTR (*cystic fibrosis conductance regulator*), cuja principal função é regular o transporte de íons cloro na superfície apical das células epiteliais do pâncreas, e dos tratos respiratório, gastrointestinal, hepatobiliar e reprodutivo (MISHRA *et al.*, 2005).

A correlação entre os genótipos e fenótipos da FC é extremamente variável. Apesar do quadro pancreático apresentar uma forte associação com mutações no gene *CFTR*, o mesmo não ocorre com o quadro pulmonar pacientes da mesma família com as mesmas mutações podem apresentar quadros clínicos diferentes (GUILLOT *et al.*, 2014). Estas modulações podem ser decorrentes da ação do meio ambiente sobre o indivíduo ou devido à ação de genes modificadores (MARSON *et al.*, 2013).

A proteína CFTR está presente na membrana apical das células epiteliais dos tecidos exócrinos; é capaz de regular a fisiologia epitelial em vários níveis, incluindo a modulação de outros canais de íons e a regulação do transporte da membrana intracelular (JILLING e KIRK, 1997; BRADBURY, 1999; SCHWIEBERT *et al.*, 1999) de íons cloreto, sódio e água (RIBEIRO *et al.*, 2002). Um defeito no transporte destes íons causa aumento da viscosidade das secreções ocasionando desidratação das secreções do trato respiratório, pancreático, hepático, intestinal, geniturinário e a presença de suor salgado.

(OLIVER *et al.*, 2009). No entanto é necessário somente de 6 a 10% de proteína CFTR normal para que uma célula FC recupere um transporte de cloro similar ao de células com 100% de proteína CFTR normal. A união célula-célula parece ser o mecanismo de amplificação dos efeitos das células corrigidas (JOHNSON *et al.*, 1992).

O aumento da viscosidade do muco, desidratação do líquido surfactante e diminuição do transporte mucociliar, concedem um ambiente propício ao desenvolvimento de infecções bacterianas (LYCZAK *et al.*, 2002).

A incidência da FC varia de acordo com a origem étnica, sendo bastante frequente entre europeus e eurodescendentes (cerca de 1: 2500 nascidos vivos e uma frequência de heterozigotos de 1/25) (RASKIN *et al.*, 2007; 2008). Nos Estados Unidos ocorre em aproximadamente 1: 3500 nascimentos (FARREL *et al.*, 2008), e é rara em orientais (1:90.000 nascidos vivos) (TAUSSIG, 1984; WRIGHT e MORTON, 1968). No mundo inteiro mais de 50.000 indivíduos são afetados e um número bem maior de indivíduos carrega o gene defeituoso que causa a FC (GOVAN e DERETIC, 1996). No Brasil, a incidência de FC varia entre 1: 7.500 em brasileiros eurodescendentes dependendo da região, e 1: 15.300 em brasileiros afro-descendentes (RASKIN *et al.*, 2007; FIRMIDA e LOPES, 2011).

A doença pulmonar é um componente importante na FC, pois a maioria dos pacientes vai a óbito devido à doença pulmonar ocasionada por infecções bacterianas (CHAKR *et al.*, 2006). Apesar dos avanços no conhecimento desta doença, a cura ainda não está disponível e, em decorrência de suas características, o seu tratamento deve ser realizado em centros de referência, por equipe multidisciplinar. O diagnóstico precoce parece ser a única forma de garantir ao paciente qualidade de vida (FARIAS *et al.*, 1997) e evitar a sua morte ainda na infância.

As crianças com FC nascem com os pulmões normais. A tosse e o acúmulo de secreções podem ocorrer precocemente, geralmente desencadeados por infecções virais (OLIVER *et al.*, 2009). Em seguida, observa-se a colonização do trato respiratório por patógenos peculiares à fibrose cística que levam à deterioração da função pulmonar.

A infecção crônica do trato respiratório é uma das manifestações clínicas mais predominantes, associada com maior risco de mortalidade em pacientes com FC (ROVEDDER *et al.*, 2003; GOVAN e DERETIC, 1996).

O exame bacteriológico das secreções do trato respiratório inferior de afetados reflete com precisão quais as bactérias infectantes. *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenzae* são geralmente os primeiros organismos detectados, seguidos de *Pseudomonas aeruginosa* não mucóide que geralmente se altera para mucóide. Outras bactérias emergentes estão sendo detectadas, como as do complexo *Burkholderia cepacia*, que levam a um pior prognóstico da função pulmonar. Por esse motivo, deve ser realizada a cultura das secreções para identificar e tratar corretamente as infecções (CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION, 2005).

Fatores de mau prognóstico na doença pulmonar incluem infecções respiratórias por *Pseudomonas aeruginosa* (BONADIA *et al.*, 2014) ou pelo complexo *Burkholderia cepacia* (LIPUMA *et al.*, 2010), e complicações pulmonares como pneumotórax e hemoptises maciças (HURT e BILTON, 2012; FIRMIDA e LOPES, 2011).

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria aeróbica, um bacilo gram-negativo, e é a causa mais comum de infecção em pacientes FC, sendo que 70 a 90% dos pacientes têm a chance de serem infectados por ela (REIS, 1998). A partir de uma primeira infecção por *P. aeruginosa* o paciente fibrocístico dificilmente será totalmente descolonizado, com consequente maior comprometimento das funções pulmonares (SANTANA *et al.*, 2003).

O complexo *Burkholderia cepacia* (cBc), abundante no solo e na rizosfera das plantas (MAHENTHIRALINGAM *et al.*, 2005), faz parte de um grupo de agentes de grande risco na FC, associado a pior prognóstico e aumento significativo de morbidade e mortalidade, resultante de uma bacteremia rápida, progressiva, invasiva e fatal. É intrinsecamente resistente a múltiplos antibióticos e apresenta um risco potencial de infecções cruzadas entre os doentes (SPEERT, 2002; SAIMAN e SIEGEL, 2004; CORREIA *et al.*, 2008; LIPUMA *et al.*, 2001).

O tratamento das infecções do trato respiratório por antibioticoterapia é considerado o principal fator para o aumento da expectativa de vida dos pacientes com FC nas últimas décadas (RATJEN e DORING, 2003), pois no

passado a maioria dos pacientes ia a óbito ainda na infância devido a infecções estafilocócicas. Atualmente os pacientes podem ter a expectativa de atingir a idade adulta devido à possibilidade do diagnóstico precoce e tratamento eficaz com terapias antibióticas agressivas, na tentativa de erradicar micro-organismos lesivos ao tecido pulmonar que levam à rápida deterioração da função respiratória (HOFFMANN e PROCIANOY, 2011). Em relação à escolha da abordagem terapêutica, HEWER e SMYTH (2009) em uma recente revisão sistemática concluíram que as evidências são insuficientes para recomendar uma estratégia antibiótica específica, mas são suficientes para concluir que o tratamento precoce e intensivo resulta em erradicação microbiológica por vários meses ou anos.

O diagnóstico da colonização/infecção das vias respiratórias para a identificação do patógeno predominante (WONG *et al.*, 1984) é realizado com a técnica de cultura quantitativa de secreções respiratórias que podem ser obtidas por esforço de tosse com presença escarro, *swab* de orofaringe, lavado bronco pulmonar e aspiração transtraqueal. Segundo a *Cystic Fibrosis Foundation*, devem ser obtidas amostras respiratórias nas seguintes situações: para estudo microbiológico ao menos 1 a cada 3 meses em pacientes clinicamente estáveis e sem exacerbações pulmonares, durante os quadros de exacerbações pulmonares, em casos de alterações no quadro clínico, hospitalizações, ou por motivos epidemiológicos (OLIVER *et al.*, 2009).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a evolução da microbiota das vias aéreas de pacientes com fibrose cística do Estado do Paraná, acompanhados pelo ambulatório de FC do HC da UFPR no último quinquênio.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as colonizações por bactérias e fungos presentes nas culturas de secreção de orofaringe ou de escarro de pacientes com fibrose cística.
- Verificar a presença do complexo *Burkholderia cepacia* em secreções pulmonares de fibrocísticos, e a presença de co- colonizações associadas ao complexo *Burkholderia cepacia*.
- Comparar as colonizações pulmonares de um grupo de pacientes triados e acompanhados desde o 1º mês de idade com as de um grupo de crianças triadas e acompanhadas a partir de 2 anos de seguimento.
- Identificar o tempo necessário para o aparecimento das primeiras colonizações com os principais patógenos.
- Correlacionar o tempo de inclusão no programa (após o nascimento) com as colonizações detectadas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 HISTÓRICO

A primeira referência na literatura sobre portadores de FC ocorreu no século XVI, decorrente do registro de autópsia de uma menina de 11 anos que presumivelmente foi a óbito decorrente de lesões pancreáticas relacionadas à FC (RODRIGUES *et al.*, 2008 *apud* Quiton, 1999).

Quase três séculos depois, em 1905, Landsteiner fez a primeira descrição anatomo-patológica da FC em recém-nascidos falecidos no quinto dia de vida por íleo meconial (REIS e DAMACENO, 1998), relacionando com insuficiência pancreática exócrina (RIBEIRO *et al.*, 2002). Em 1936 Fanconi referiu-se à doença como fibromatose cística (RODRIGUES *et al.*, 2008), devido a apresentar características clínicas de doença celíaca, porém com insuficiência pancreática exócrina associada à doença pulmonar, o que a diferenciava da doença clássica (RIBEIRO *et al.*, 2002).

Em 1938 a síndrome da "Fibrose cística do pâncreas" foi descrita pela primeira vez por Dorothy Andersen, em um estudo detalhado (GILLIGAN, 1991) que abordava os aspectos clínicos, anatomo-patológicos e epidemiológicos da síndrome (ANDERSEN D. H., 1938). Este estudo, que estabeleceu a base genética da FC, foi realizado com 49 pacientes de FC que foram categorizados em 3 grupos baseados na idade de morte. O grupo I era constituído de pacientes que morreram com 1 semana de vida, o grupo II de pacientes que morreram entre 1 semana e 6 meses, e o grupo III com pacientes que morreram entre 6 meses e 14,5 anos. A causa da morte nos pacientes do grupo I foi obstrução intestinal, e nos pacientes dos grupos II e III foi por complicações respiratórias. As observações feitas no estudo permitiram entender a FC como uma doença única, mas com diversos efeitos (LIYCZAK *et al.*, 2002). A designação "Fibrose Cística do pâncreas" foi derivada da descoberta de que as crianças que morriam no período neonatal tinham lesões histopatológicas características no pâncreas. Foi ainda possível fazer a descrição de dois problemas fisiopatológicos importantes na FC: insuficiência pancreática relacionada à má nutrição, bem como infecções das vias aéreas,

ambas relacionadas com a descoberta que esses pacientes produziam secreções extremamente viscosas (GILLIGAN, 1991).

Farber em 1945 acreditava que era o espessamento generalizado das secreções que levava a lesões pulmonares e pancreáticas, utilizando o termo “mucoviscidose” (REIS e DAMACENO, 1998). Um ano mais tarde Andersen e Hodges mostraram pela primeira vez que a doença tinha origem genética e que resultava de uma mutação autossômica recessiva (RODRIGUES *et al.*, 2008).

Em 1948, Paul di Sant`Agnese observou durante uma forte onda de calor em Nova Iorque, alta incidência de “prostração” em crianças com FC e atribuiu isto a perda excessiva de sal no suor (REIS e DAMACENO, 1998). Mais tarde foi demonstrado que o suor dos pacientes portadores de fibrose cística continha concentrações altamente anormais de íons sódio, cloreto e potássio (DI SAINT`AGNESE *et al.*, 1953). Esta observação, estimulou a padronização do teste de coleta do suor para diagnóstico da FC, que até hoje é considerado "padrão ouro no diagnóstico" e que posteriormente foi padronizado por Gibson e Cooke, em 1958 (GIBSON e COOKE, 1959).

A descoberta de Crossley em 1979, ainda hoje é utilizada para diagnóstico da FC na triagem neonatal; o autor detectou o aumento do tripsinogênio no Plasma (TIR- tripsina imuno reativa), em pacientes FC, que se refere à função pancreática (CROSSLEY *et al.*, 1979).

Em 1985 o gene responsável pela FC foi localizado em uma região específica do cromossomo 7q3.1 (TSUI; L.C., 1995); em setembro de 1989 foi clonado, sequenciado e identificado a mutação mais frequente (KEREM *et al.*, 1989). Em 1990 a proteína reguladora transmembrânica da FC (CFTR) foi descrito como um canal de cloro (GOVAN e DERETIC, 1996). Estas descobertas permitiram o diagnóstico mais preciso da doença, e uma melhor compreensão dos transtornos clínicos decorrentes da deficiência da proteína (CFTR) da FC (RODRIGUES *et al.*, 2008).

Devido principalmente ao diagnóstico precoce, à instituição de programas de tratamento e ao surgimento de centros de atendimento especializado, a mediana da expectativa de vida dos pacientes FC aumentou de 10 anos em 1986, para 28 anos em 1990, e a partir de 1990 aumentou para 40 anos (LIMA *et al.*, 2004). É provável que continue a aumentar no decorrer da próxima década com o aperfeiçoamento no tratamento médico, aumento da

disponibilidade do transplante de pulmão, melhor conhecimento entre a relação genótipo e fenótipo e a possibilidade de cura com a engenharia genética (FARIAS *et al.*, 1997). A partir dos anos 90, estudos para substituição do gene da FC defeituoso têm sido realizados com sucesso em experimentos feitos em laboratórios de cultura celular (LIMA *et al.*, 2004). Os mais recentes progressos nas estratégias de tratamento estão focados na identificação de compostos que potencializem a atividade da CFTR, restaurando sua regulação endógena – o transporte de íons (CABELLO, 2011).

3.2 DIAGNÓSTICO

Apesar de muitas vezes ser difícil, o diagnóstico de FC no Brasil vem aumentando. Este aumento se deve a um maior conhecimento e preocupação relacionados à doença em escolas médicas e também à divulgação para a população em geral, por meio de campanhas de esclarecimento. O diagnóstico precoce já pode ser feito intra-útero por volta da 12^o semana através de biopsia da vilosidade coriônica com subsequente análise genética do material, e no período neonatal, com a implantação da Triagem Neonatal para FC (Neto *et al.*, 2008).

O diagnóstico tardio é geralmente clínico, por apresentar uma variedade de sintomas, incluindo: infecções respiratórias crônicas, anormalidades gastrointestinais levando a má absorção e déficits nutricionais (LIYCZAK *et al.*, 2002), insuficiência pancreática exócrina, íleo meconial, obstrução intestinal, esteatorréia, déficit pondero-estatural (DORNELAS *et al.*, 2000) entre outros, podendo ser confirmado pela demonstração de níveis elevados de íons cloro no suor ($\geq 60\text{mmol/L}$ determinados em 2 ou mais ocasiões com teste quantitativo de iontoforese por pilocarpina), que é considerado padrão ouro para diagnóstico da FC (LIYCZAK *et al.*, 2002; LEMOS *et al.*, 2004).

Adicionalmente como critérios para o diagnóstico podem ainda ser considerados, história familiar positiva para FC ou teste de triagem neonatal positivo, transporte anormal de íons evidenciado por altas concentrações de sódio e cloro no suor, elevada diferença do potencial elétrico no epitélio nasal (RATJEN e DORING., 2003), ou ainda identificação de duas mutações no gene *CFTR* (ROSENSTEIN e CUTTING, 1998).

Segundo a diretriz para diagnóstico de FC em recém-nascidos e adultos estabelecida no *Cystic Fibrosis Foundation Consensus Report*, o diagnóstico envolve uma combinação de apresentação clínica, testes de laboratório e de genética para confirmar o diagnóstico (FARREL *et al.*, 2008). O quadro 1 mostra os principais sinais e sintomas da apresentação clínica.

Qualquer idade

- Histórico familiar de FC, pele com sabor salgado, baqueteamento de dedos das mãos e pés, tosse com expectoração, *Pseudomonas aeruginosa* mucoide isolada a partir de secreções de vias aéreas, alcalose metabólica hipoclorêmica

Neonatal

- Íleo meconial, icterícia prolongada, calcificação abdominal ou escrotal, atresia intestinal.

Primeira Infância

- Radiografia de tórax com persistente infiltrado, falha de crescimento, edema generalizado ou hipoproteinemia, diarreia crônica, distensão abdominal, colestase, pneumonia por *Staphylococcus aureus*, hipertensão intracraniana idiopática (deficiência de vitamina A), anemia hemolítica (deficiência de vitamina E)

Infância

- pansinusite crônica ou pólipos nasais esteatorréia, prolapso retal, síndrome de obstrução intestinal distal, pancreatite idiopática recorrente ou crônica, doença hepática.

Adolescente e adulto

- aspergilose broncopulmonar alérgica, pansinusite crônica ou pólipos nasais, bronquiectasias, hemoptise, pancreatite idiopática recorrente, hipertensão portal, atraso da puberdade, azoospermia secundária a ausência congênita bilateral dos canais deferentes.

QUADRO 1 – SINAIS E SINTOMAS DE FIBROSE CÍSTICA

FONTE: SULLIVAN e FREEDMAN (2009)

Nos países desenvolvidos a maioria dos pacientes tem diagnóstico estabelecido antes dos dois anos de idade (RIBEIRO *et al.*, 2002). Nos Estados Unidos o diagnóstico consegue ser confirmado em 50% dos pacientes aos 6

meses de idade (RATJEN e DORING, 2003). No Brasil, 40 a 50% dos casos são diagnosticados após três anos de idade (RIBEIRO *et al.*, 2002).

É essencial que se confirme ou exclua o diagnóstico de FC o mais precocemente possível, e que este seja executado com elevado grau de precisão (ROSENSTEIN e CUTTING, 1998). Através do diagnóstico precoce é possível instituir tratamento e monitoramento adequado para as variáveis que influenciam diretamente na sobrevida, como, por exemplo, o acompanhamento da curva pondero-estatural e a presença de colonização de vias aéreas inferiores por patógenos, que têm íntima relação com pior prognóstico e com a taxa de sobrevida. Sendo assim, por meio destas medidas é possível otimizar o prognóstico (SOUZA *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2005).

3.2.1 Critérios diagnósticos

É consenso que o diagnóstico tradicional para a doença clássica seja baseado na presença de uma ou mais características fenotípicas (doença pulmonar ou gastrointestinal típica), história familiar de FC, teste de triagem neonatal positivo, evidência laboratorial de uma anormalidade da CFTR documentada pela elevada concentração de cloreto no suor, ou identificação de mutações no gene *CFTR* conhecidas como causadores de FC, ou, ainda, alterações no transporte de íons através do epitélio nasal (RATJEN e DORING, 2003).

Mesmo quando estes critérios não são verificados, a doença não pode ser completamente excluída. Em muitos pacientes com doença atípica, incluindo a maioria que detecta a doença na fase tardia da infância ou mesmo na idade adulta, o diagnóstico da FC torna-se mais complicado e exige outros instrumentos avaliadores tais como: genotipagem do *CFTR* para as principais mutações da FC, diferença de potencial nasal, e análise da biópsia da mucosa retal (RATJEN e DORING, 2003).

Testes clínicos que não avaliam diretamente o defeito da CFTR também podem auxiliar no diagnóstico, como o exame da função pancreática, concentrações fecais reduzidas de quimotripsina ou elastase podem confirmar a doença, pois cerca de 80 a 90% dos pacientes apresentam insuficiência

pancreática. Do mesmo modo radiografias de face para confirmar a obstrução de seios da face com sinusopatias, culturas para detecção de bactérias patogênicas comuns na FC como *P. aeruginosa*, e espermograma para avaliar casos de infertilidade que são frequentes na FC, devido à agenesia congênita bilateral dos vasos deferentes decorrentes da mutação do gene *CFTR*. Apesar de todos estes testes, alguns pacientes ainda permanecem sem certeza do diagnóstico (RATJEN e DORING, 2003).

3.2.2 Dosagem de tripsina imunorreativa (TIR)

A dosagem da TIR é usada no programa de triagem neonatal para identificar crianças com risco de desenvolver FC (FARREL *et al.*, 2008), sendo um indicador indireto da doença, pois avalia apenas a integridade da função pancreática. As proporções de exames falso-positivos e falso-negativos são relativamente elevadas (RIBEIRO *et al.*, 2002).

O aumento da tripsina imunorreativa no sangue foi observado pela primeira vez por Crossley em 1979 sendo usado até hoje no protocolo de rastreio para FC citado pelo grupo de RODRIGUES (2008). Admite-se que o aumento seja secundário ao refluxo de secreção pancreática, provocado pela obstrução dos ductos pancreáticos. O teste pode ser realizado com amostra de sangue recolhida sobre papel filtro, como na coleta para fenilcetonúria e hipotireoidismo. No Brasil está sendo implantado como parte do “teste do pezinho ampliado” desde 2001 (RIBEIRO *et al.*, 2002), e já apresenta resultados positivos em relação a média de idade ao diagnóstico que diminuiu para 9 semanas se comparada à média de 4 anos de idade sem a triagem (SANTOS *et al.*, 2005).

Quando o teste for positivo (valores acima do padrão adotado, 70 a 140ng/mL), deverá ser repetido em um intervalo de 15 – 30 dias, e caso persista positivo, o paciente deverá ser submetido ao teste do suor para confirmar o diagnóstico de FC. O teste com a TIR negativo não exclui FC (SANTOS *et al.*, 2005).

Para diminuir os riscos de resultados falso-positivos e aumentar a taxa de detecção da doença com o exame da TIR, um grupo de pesquisadores

australianos usou a estratégia de analisar o DNA da primeira amostra de TIR que apresentasse valores acima do valor de corte (sugestivos de FC), para detectar a presença de mutação no gene *CFTR* e confirmar o diagnóstico sem a necessidade de nova amostra de TIR ou teste do suor. Desta forma evidenciaram menos resultados falso-positivos, diminuição da ansiedade familiar e a possibilidade de aconselhamento genético precocemente (RODRIGUES *et al.*, 2008).

3.2.3 Teste do suor

Desde 1948 quando Paul di Sant'Agnesse identificou o excesso de sal no suor de pacientes com FC, na maioria dos casos o diagnóstico de FC é confirmado pela medida da concentração de cloreto no suor (teste do suor), utilizando o método de iontoforese por pilocarpina padronizado por Gibson e Cooke. O teste é considerado padrão-ouro para o diagnóstico da FC, com elevada sensibilidade e especificidade (>95%), baixo custo e a vantagem de não ser invasivo (RIBEIRO *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2005).

A quantidade de suor necessária é de no mínimo 100mg. O resultado é positivo quando a concentração de cloro é $\geq 60\text{mEq/L}$, sendo necessário para se confirmar o diagnóstico a obtenção de dois testes positivos, realizados em momentos diferentes (RIBEIRO *et al.*, 2002). Em casos especiais, principalmente em casos duvidosos quanto à dosagem de cloro no suor, pode ser útil fazer-se também a dosagem de sódio no suor; em pacientes com FC ambos os eletrólitos cloro e sódio estão elevados, sendo que a diferença de um para o outro não pode ultrapassar 20mmol/L (REIS e DAMANCENO, 1998).

É necessário também observar a idade para a correta interpretação do teste, pois ocorre um decréscimo da concentração de cloro gradualmente com o aumento da idade em indivíduos saudáveis. Um estudo com 103 crianças sem FC encontrou uma média de 23,3 mmol/L nos primeiros 3 – 7 dias de vida, 17,6 mmol/L com 8 – 14 dias e 13,1 mmol/L após 6 semanas de vida. Os resultados deste estudo corroboram a recomendação de que o valor de cloreto no suor $\geq 30\text{ mmol/L}$ em crianças menores de 6 semanas de idade deve ser

considerado anormal, devendo-se repetir o teste para confirmar o diagnóstico (FARREL *et al.*, 2008).

A *Cystic Fibrosis Foundation* recomenda os seguintes valores de referência de cloreto no suor para crianças até 6 meses de idade: $\leq 29\text{mmol/L}$ é considerado improvável que seja FC; 30 a 59mmol/L é considerado intermediário, devendo realizar outros testes diagnósticos para confirmar ou excluir a doença, e níveis $\geq 60\text{mmol/L}$ é indicativo de FC. Indivíduos com valores $\leq 40\text{mmol/L}$ acima de 6 meses de idade devem repetir o teste de suor, e incluir a análise de DNA para as principais mutações do gene *CFTR* em busca de confirmação ou exclusão diagnóstica (FARREL *et al.*, 2008).

3.2.4 Diferença do potencial nasal

O epitélio respiratório, incluindo o epitélio nasal, regula a composição dos fluídos que banham a superfície das vias aéreas através do transporte de íons como sódio e cloreto. Este transporte ativo de íons gera uma diferença de potencial elétrico transepitelial (PD) que pode ser medido *in vivo* e *in vitro*. As anormalidades no transporte de íons no epitélio respiratório de pacientes com FC estão associadas com um padrão diferenciado de PD comparando-se com o epitélio normal; isto permite o uso do PD nasal como um método auxiliar para o diagnóstico de FC (ROSENSTEIN e CUTTING, 1998).

3.2.5 Análise das mutações

A identificação do gene da FC, assim como das mutações que se relacionam com as manifestações clínicas (relação genótipo–fenótipo), levantou a possibilidade do diagnóstico da FC através da análise das mutações pelo teste de DNA. Aproximadamente 2000 mutações já foram identificadas (BONADIA *et al.*, 2014), o que dificulta a confirmação do diagnóstico baseado apenas no teste do DNA (GUILLLOT *et al.*, 2014).

Indivíduos com manifestações clínicas consistentes com FC, mais a identificação de duas mutações conhecidas de FC, confirma o diagnóstico. O achado de uma única mutação, porém deve ser associado à confirmação de

disfunção da CFTR, além de manifestações clínicas compatíveis com FC (ROSENSTEIN e CUTTING, 1998). Já um paciente que apresenta quadro clínico compatível e teste do suor não conclusivo, mas com identificação de duas mutações conhecidas, tem o diagnóstico de FC confirmado (RIBEIRO *et al.*, 2002).

Logo, é consenso que a análise das mutações pode: confirmar o diagnóstico, fornecer informações genéticas das características fenotípicas para os familiares, assim como propiciar aconselhamento genético (ROSENSTEIN e CUTTING, 1998).

A incidência da principal mutação da FC, a $\Delta F508$, difere entre populações e regiões geográficas sendo na Argélia e na Venezuela em torno de 26%, 47% no Brasil e 87% na Dinamarca. No Brasil, além da $\Delta F508$ as 4 mutações mais frequentes são: G542X, N1303K, R1162X e Z183AA-G, que juntas representam 82% dos alelos da FC, mas suas frequências variam de Estado para Estado (FAUCZ *et al.*, 2007; RASKIN *et al.*, 2008; DANIELI *et al.*, 2014).

3.2.6 Triagem neonatal

A Organização Mundial da Saúde, em 1997, recomendou aos países em desenvolvimento a implantação da triagem neonatal para determinar a incidência e identificar os recém-nascidos afetados, assim como a implementação de laboratórios para identificar as mutações da FC, e o desenvolvimento de centros de diagnóstico e tratamento com equipe multidisciplinar (ALVAREZ *et al.*, 2004). Apenas em 2001, porém com a aprovação do Programa Nacional de Triagem Neonatal e com a implantação do programa pelo laboratório da Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional do Paraná (FEPE-PR), concretizou-se a realização da triagem para FC no Paraná, uma iniciativa pioneira no Brasil (SANTOS *et al.*, 2005).

Antes da instituição do programa, a idade média ao diagnóstico no estado do Paraná era de 1,6 anos. Essas crianças já apresentavam, no momento do diagnóstico, uma desnutrição importante e colonização precoce por micro-organismos habituais na FC, além de alta morbidade até o

diagnóstico. A média de internações por ano era de uma a quatro por criança, com duração aproximada de 10 a 60 dias (SANTOS *et al.*, 2005).

Segundo a avaliação do Programa de Triagem Neonatal realizada após 30 meses de sua implantação no Paraná, a porcentagem de crianças diagnosticadas, considerando-se o número total de crianças triadas, foi satisfatória, pois o número médio de diagnósticos no serviço aumentou de 8 para 18 casos por ano, e a média de idade de diagnóstico passou de 1,6 anos para 2 meses de vida (SANTOS *et al.*, 2005). Dados atualizados da FEPE-PR, (2014) mostram que, de 2001 a 2013, dos 2.114.339 recém-nascidos triados para FC, 194 foram diagnosticados com FC oficializando uma incidência de 1:7800 nascimentos no Paraná.

Estudo multicêntrico realizado no Reino Unido por SIMS e cols. (2005) comparou pacientes diagnosticados pela triagem neonatal com pacientes (não triados) diagnosticados apenas clinicamente. Verificou-se que os pacientes maiores que seis anos que foram triados tinham significativamente maior altura, melhores escores da radiografia de tórax, e menores taxas de infecção crônica por *P. aeruginosa* comparado com o grupo não triado para a mesma faixa etária e mutação genética, mostrando que as crianças que passam pela triagem neonatal apresentam benefícios nutricionais com melhora da altura mediana e redução da morbidade (SIMS *et al.*, 2005).

Em um trabalho randômico, realizado pelo grupo de estudos de Wisconsin com objetivo de investigar os potenciais benefícios da triagem neonatal para os FC, mostrou que o ganho de peso e altura precoce foi melhor nos pacientes diagnosticados pela triagem neonatal do que naqueles que não foram diagnosticados por este método, sem melhora, porém no escore da radiografia de tórax. Já o estudo australiano de Waters *et al.* (1999) mostrou melhora significativa da função pulmonar e reduzida colonização por *P. aeruginosa* após a implantação do programa de triagem neonatal (SIMS *et al.*, 2005; WATERS *et al.*, 1999).

É consenso que o diagnóstico precoce indiscutivelmente proporciona repercussões benéficas sobre o estado nutricional e a prevenção à desnutrição, com suas implicações sobre o aparelho respiratório e cognitivo, os benefícios do tratamento em centros de referência especializados no atendimento a estes pacientes, a prevenção de complicações, o

aconselhamento genético, e o conhecimento da história natural da doença (SANTOS *et al.*, 2005), são decisivos no prognóstico, pela maior sobrevida com melhor qualidade de vida (FARIAS *et al.*, 1997).

3.3 EPIDEMIOLOGIA DA FIBROSE CÍSTICA

O quadro epidemiológico da doença tem sofrido mudanças significativas nas últimas três décadas, quando se avaliam os dados dos países desenvolvidos. Nos Estados Unidos havia em 1969 cerca de 8.000 indivíduos oficialmente registrados com FC; em 1991, 18.926; em 1996 foram diagnosticados mais 900 afetados (4,3%), aumentando esse número para 20.886. A estimativa é de que 90% dos afetados vivos com FC estejam diagnosticados. O número de afetados que atingiram a idade adulta mais que quadruplicou nas últimas décadas (de 8% em 1969 para 36% em 1996). A mediana de sobrevida aumentou trinta vezes nos últimos cinquenta anos e duas vezes nos últimos vinte anos, e vem aumentando, embora bem menos, na última década (menos de 1 ano em 1940; 14 anos em 1969; 26,8 em 1989; 27,6 em 1990; em 1991 aumentou para 29,4 anos, em 1996 atingiu 31,3 anos, e em 2005 foi de 36 anos). De acordo com a *Cystic Fibrosis Foundation* (2010) a mediana de idade aumentou drasticamente em duas décadas, pois em 1986 era de 27 anos, e em 2010 era de 38,3 anos. Observações sobre a sobrevivência tem mostrado uma melhora na faixa etária dos 2 aos 15 anos. Entre 1985 a 1999 a taxa de mortalidade caiu 61% para pacientes dos 2 aos 5 anos de idade, 70% para pacientes de 6 a 10 anos de idade e 45% para pacientes de 11 a 15 anos (STRAUSBAUGH e DAVIS, 2007). A taxa de mortalidade em 1996 foi de 1,9 em cada 100 afetados e o número de óbitos foi de 391; nesse ano cerca de 50% dos afetados já haviam sido genotipados. A proporção, por sexo, de indivíduos afetados é de 1:1, não havendo evidência de segregação meiótica preferencial para os alelos FC (PEREIRA, 2003).

A FC é uma das doenças genéticas mais comuns que afetam euro descendentes nos Estados Unidos. Aproximadamente 30.000 indivíduos têm FC nos EUA, 7 milhões são portadores assintomáticos do gene da FC. A incidência varia de acordo com o grupo (eurodescendentes: 1: 3200; afro

americanos: 1:15.000; e asiáticos americanos: 1: 31.000) (STRAUSBAUGH e DAVIS, 2007; FITZSIMMONS, 1993). No Brasil um estudo realizado no centro de estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo por BERNARDINO *et al.*, (2000), que analisou 160 pacientes brasileiros com FC, detectou 117 (73%) eurodescendentes e 43 (27%) de origem racial mista (euro descendentes, afrodescendentes e/ou indígenas nativos), isto porque a população é muito heterogênea decorrente das migrações irregulares nas varias regiões brasileiras.

No Brasil e na América Latina a incidência de FC é desconhecida. Não existem estudos epidemiológicos ou de triagem neonatal abrangentes que permitam estimar a incidência nas diversas regiões do país. Há estimativas de que 10% do total anual de afetados são diagnosticados, o que confere uma impressão errônea de baixa incidência na população brasileira. Na Região Sul do país, a incidência estimada é mais próxima da população centro-europeia, enquanto que, para outras regiões, diminui para cerca de 1:10000 nascidos vivos (NETO, 2009). Raskin (2001), analisando 2.683 recém-nascidos de cinco estados brasileiros, observou que a incidência da doença no Sul e Sudeste é de 1:7.576 nascidos vivos (Tabela 1). No Estado do Rio Grande do Sul, foi observada a mais alta frequência, variando entre 1: 1.600 e 1: 6.700 (similar à maioria dos países europeus). Isso implica que 1: 20 habitantes é portador do gene da FC.

TABELA 1 – INCIDÊNCIA DA FIBROSE CÍSTICA (FC) EM INDIVÍDUOS DO SUL E SUDESTE DO BRASIL

ESTADO	INCIDÊNCIA	PORTADORES DO GENE CFTR
Rio Grande do Sul	1: 1.587	1: 20
Santa Catarina	1: 12.195	1: 56
Paraná	1: 6.803	1: 42
São Paulo	1: 32.258	1: 90
Minas Gerais	1: 21.277	1: 73
Total	1: 7.576	1: 44

FONTE: RASKIN (2001)

Os avanços obtidos nas últimas duas décadas devem-se à capacidade de diagnóstico precoce e ao tratamento adequado dos indivíduos afetados, o que resultou em nítida melhora na taxa e na qualidade de sobrevivência.

3.4 GENÉTICA DA FIBROSE CÍSTICA

O gene da FC foi identificado e clonado em 1989 (KEREM *et al.*, 1989b; RIORDAN *et al.*, 1989; ROMMENS *et al.*, 1989), localiza-se no braço longo do cromossomo 7, no locus q31; é formado por 250Kb de DNA, com 27 éxons (figura 1), codifica um RNA mensageiro de 6,5Kb, que transcreve uma proteína transmembrana, reguladora do transporte iônico, composta por 1.480 aminoácidos, conhecida como CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) (REIS e DAMACENO, 1998). Também conhecida como canal de cloro, é sintetizada e sofre maturação em organelas citoplasmáticas, localizando-se na membrana apical das células epiteliais. A CFTR é essencial para o transporte de íons através da membrana celular, estando envolvida na regulação do fluxo de íons cloreto, sódio e água (RIBEIRO *et al.*, 2002), sendo componente epitelial essencial de muitos órgãos, incluindo: intestinos, pâncreas, pulmões, glândulas sudoríparas e rins (AKABAS, 2000).

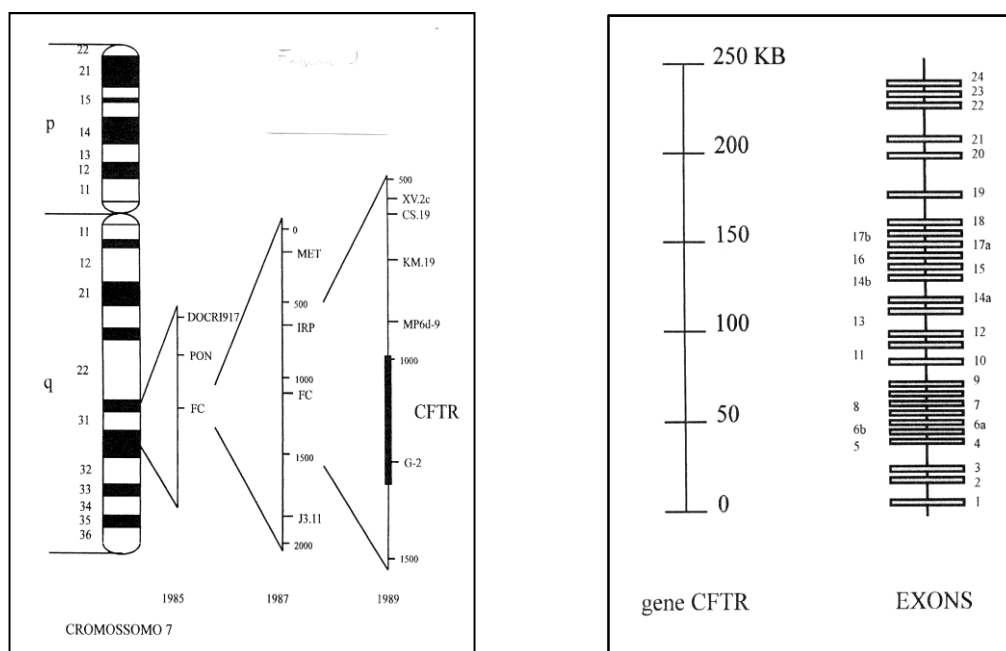


FIGURA 1- PASSOS DA CLONAGEM E LOCALIZAÇÃO DO GENE *CFTR* e DISTRIBUIÇÃO DOS ÉXONS DO GENE *CFT*

FONTE: TIZZANO E BUCHWALD (1992)

O maior determinante do transporte epitelial de cloretos é o nível de ativação da proteína CFTR que depende do nível de fosforilação determinado pelas atividades relativas de quinases e fosfatases, que normalmente são reguladas por hormônios. Com relação à regulação da CFTR, dois processos separados controlam a passagem no canal: a fosforilação e a ligação e hidrólise do ATP. A fosforilação é necessária para a ativação do canal, mas não é suficiente. Após a fosforilação, a passagem entre os estados de abertura e fechamento do canal é controlada pela hidrólise de ATP. Quanto maior a fosforilação, maior a probabilidade de abertura do canal. A desativação do canal é mediada por fosfatases proteicas (AKABAS, 2000). A figura 2 mostra um desenho esquemático da proteína CFTR.

A proteína desempenha, além de sua função principal na condutância de cloro, também a absorção do sódio. Nos pulmões a hidratação do muco é mantida por secreção de cloro e absorção de sódio (RODRIGUES *et al.*, 2008), porém na FC a proteína pode estar ausente no epitélio ou apresentar alterações qualitativas e quantitativas em seu nível de expressão; assim não ocorre a reabsorção do cloro, provocando altas concentrações deste íon

(BIEGER et al., 2012), sucedendo o mesmo com o sódio, o que aumenta a concentração de água no meio intracelular, fazendo com que as secreções mucosas extracelulares se tornem mais espessas (viscosas), daí a outra denominação da doença, “mucoviscidose” (WELSH et al., 1995).

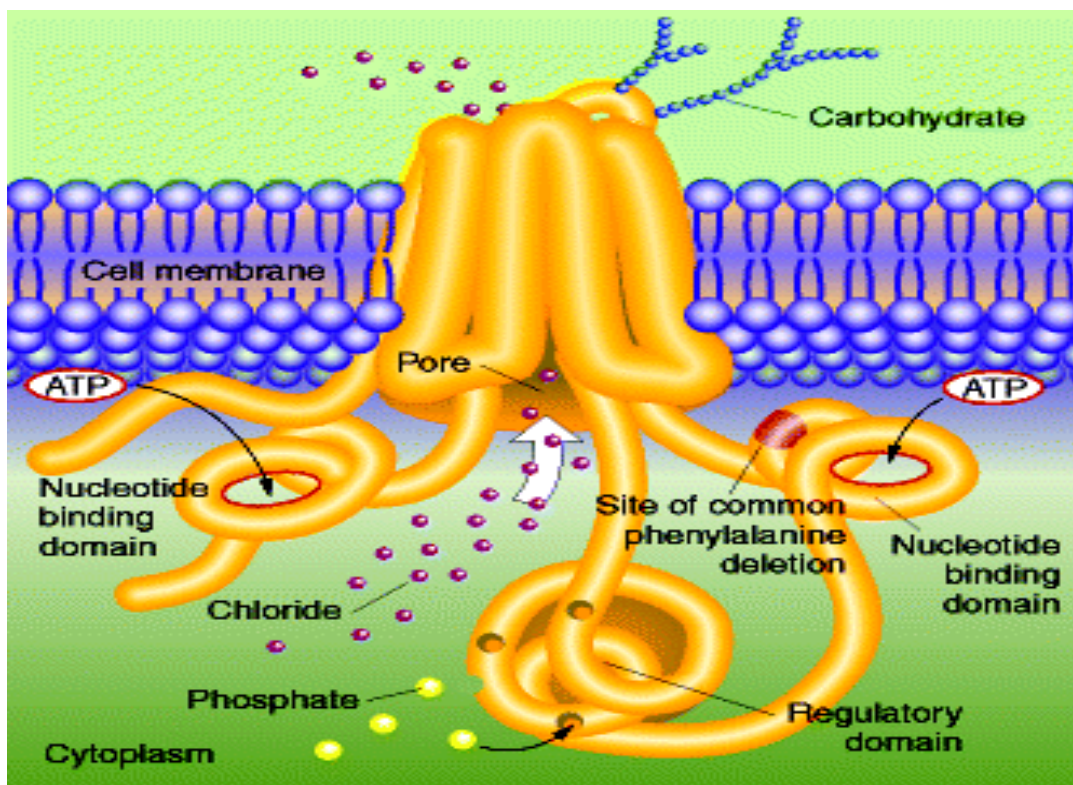


FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PROTEÍNA CFTR

FONTE: GRIFFITHS et al., (1999)

3.4.1 Mutações da FC

Os defeitos no gene que codifica a CFTR reduzem ou inibem a capacidade de transporte de íons na superfície celular causando a FC.

Mais de 2000 mutações naturais foram identificadas no gene da *CFTR*. Algumas mutações estão associadas a um fenótipo completamente normal enquanto outras causam impacto grave em vários sistemas e órgãos na FC (LIYCZAK et al., 2002). Estas mutações são distribuídas em 5 classes como visto na tabela 2, tendo como base os mecanismos que determinam a doença.

TABELA 2 - CLASSES DE MUTAÇÕES NO GENE *CFTR*

CLASSES	EFEITO	CAUSA
Classe I	Mutações que afetam a biossíntese da proteína	Redução significativa no RNAm acarretando uma proteína incompleta e inativa
Classe II	Mutações que afetam a maturação das proteínas	Mutações dessa classe impedem que a proteína mature, deixando-a inativa
Classe III	Mutações que afetam a regulação do canal de cloro	Resultam na incapacidade da proteína realizar as funções fisiológicas de canal de cloro.
Classe IV	Mutações que afetam a condutância iônica.	A proteína se encontra na membrana, porém não possui capacidade de transporte de íons.
Classe V	Mutações que inibem a síntese	Mutações em sítios promotores e alterações que provocam <i>splicing</i> alternativo resultando na inativação da proteína.

FONTE: ADAPTADO DE RODRIGUES *et al.*, (2008).

As mutações I, II e III são associadas com formas clínicas mais graves, resultando em completa perda da função do canal de cloro, enquanto as mutações IV e V estão associadas a manifestações clínicas mais brandas, relacionadas à condutância alterada ou redução na síntese normal da *CFTR* (RODRIGUES *et al.*, 2008; STRAUSBAUGH e DAVIS, 2007). Apesar das diferentes categorias de mutação, a anormalidade no gene *CFTR* irá presumivelmente provocar um transporte anormal de íons na superfície da célula epitelial e, como consequência, irá causar a desidratação das secreções (BARTH e PITT, 1998). A mutação mais comum entre os pacientes é de classe 2, causada por deleção de fenilalanina na posição 508 da proteína *CFTR* (RATJEN e DORING, 2003), que resulta em célula epitelial onde a proteína *CFTR* está ausente na membrana plasmática e, consequentemente, o transporte de cloro é deficiente.

Segundo Keren *et al.*, (1989), Riordan *et al.* (1989), e Rommens *et al.* (1989), entre as mutações encontradas para o gene *CFTR*, a mutação $\Delta F508$ possui uma frequência aproximada, mundialmente, de pelo menos 70% dos casos positivos para FC. Há grande variação na frequência relativa da mutação $\Delta F508$ entre as diferentes regiões e populações (BERNARDINO *et al.*,

2000); no norte da Europa e América do Norte atingem 70 a 90%, mas é menos frequente na população mediterrânea, em que menos de 50% dos cromossomos FC têm essa mutação (REIS *et al.*, 1998).

No Brasil, a frequência da mutação $\Delta F508$ foi estudada em 190 pacientes FC eurodescendentes, de cinco diferentes estados do Sul e do Sudeste, e observou-se a presença da mutação em 47% do total de alelos examinados. A frequência por estado variou bastante, no Rio Grande de Sul foi 49%, 27% em Santa Catarina, 44% no Paraná, 52% em São Paulo e 53% em Minas Gerais (RASKIN, 1993). Resultados semelhantes também foram evidenciados no estudo de Alvarez *et al* (2004), realizado na Unicamp- SP que observou frequência de 50% da mutação $\Delta F508$ em amostra de 104 pacientes eurodescendentes. Segundo os autores, a menor incidência dessa mutação em nosso meio, quando comparada à dos Estados Unidos, França e Argentina, provavelmente ocorre devido a grande miscigenação de raças no Brasil (ALVAREZ *et al.*, 2004).

A heterogeneidade clínica observada na FC é apenas parcialmente explicada pelas mutações descritas no gene *CFTR*. Como esta variação clínica também ocorre entre pacientes com o mesmo genótipo e em membros da mesma família, existe a hipótese de que outros fatores genéticos e/ou ambientais possam estar influenciando nesta heterogeneidade. Esta hipótese foi levantada por STERN *et al* (1978), antes mesmo de o gene ter sido clonado. Logo a heterogeneidade fenotípica deriva da heterogeneidade genotípica e ambiental, que provavelmente ocorre na evolução da FC (LUISETTI, 1997). Esta hipótese tem sido amplamente discutida e é aceita atualmente (GUILLOT *et al.*, 2014).

3.5 MICROBIOLOGIA DA FIBROSE CÍSTICA

As infecções respiratórias permanecem como a principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes com FC (MARQUES, 2011). A suscetibilidade a infecções pulmonares crônicas tem sido reconhecida desde as primeiras descrições da doença (LYCZAK *et al.*, 2002; GILLIGAN, 1991), e está normalmente associada com um número limitado de micro-organismos. Dois patógenos principais, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*

são os mais frequentemente recuperados do trato respiratório em pacientes cronicamente infectados. Outros micro-organismos encontrados em algum grau de frequência incluem *Haemophilus influenzae*, complexo *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Streptococcus pneumoniae* (GILLIGAN, 1991; SAIMAN e SIEGEL, 2004). *Aspergillus fumigatus* e *Stenotrophomonas maltophilia* foram relatados como espécies com algum significado na doença. Alguns vírus como o sincicial respiratório podem ser pelo menos parcialmente responsáveis pela deterioração do pulmão em crianças com FC, especialmente nos estágios precoces da infecção respiratória (BARTH e PITT, 1998).

A análise do padrão da evolução temporal da colonização/infecção em pacientes com FC tem uma sequência mais ou menos estabelecida dependendo da idade. Em crianças muito pequenas são mais comuns infecções por vírus respiratórios. Na primeira década de vida é mais frequente a infecção por *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*, que são rapidamente substituídos por *S. aureus* e posteriormente por *P. aeruginosa*. Na idade adulta mais de 80% dos pacientes estão cronicamente colonizados por este micro-organismo a maioria por cepas mucóides (OLIVER et al., 2009).

3.5.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) é o primeiro micro-organismo a causar infecções crônicas em pacientes jovens com FC. Na era pré-antibiótica, infecções pulmonares por esse microrganismo eram a principal causa de mortalidade. Continua sendo o principal micro-organismo, especialmente em pacientes com menos de 10 anos (GILLIGAN, 1991; OLIVER et al., 2009).

Nos primeiros estudos de pacientes com FC, em 1938, quando a média de sobrevida era de dois anos, todos os pacientes que viviam mais de uma semana eventualmente morriam devido a complicações pulmonares em que *S. aureus* era frequentemente a causa. Antes dos anos 50, a infecção estafilocócica era a maior causa de insuficiência respiratória nos pacientes que mal chegavam aos 10 anos (BARTH e PITT, 1998).

Este micro-organismo é geralmente encontrado nas secreções nasais de indivíduos saudáveis, e não na orofaringe ou nas secreções respiratórias,

embora seja considerado como um dos primeiros patógenos isolados do trato respiratório de pacientes FC. A presença de *S. aureus* no trato respiratório inferior é claramente representativa de uma situação patológica, embora nunca tenha sido adequadamente verificado o grau de patogenicidade associada à sua presença nos pulmões de FC. Isso se deve provavelmente ao fato de que antibióticos anti-estafilocócicos são rotineiramente usados nesta população de pacientes, para prevenir a progressão da infecção por *S. aureus* a um estado altamente patológico (LYCZAK *et al.*, 2002).

O uso de terapia anti-estafilocócica em várias partes do mundo levantou a questão sobre o tratamento profilático que pode aumentar a suscetibilidade a infecções por outros agentes como *Haemophilus influenzae* e *P. aeruginosa*. Em um estudo com 3.219 pacientes FC do *European Registry of Cystic Fibrosis* demonstrou que a terapia anti-estafilocócica contínua profilática aumentou os casos de culturas positivas para *P. aeruginosa*, principalmente na faixa etária de 0 – 6 anos (LYCZAK *et al.*, 2002). Esta progressão da infecção de *S. aureus* para *P. aeruginosa* foi questionada no estudo de Burns *et al.* (2001), onde os autores encontraram evidências de uma taxa de infecção por *P. aeruginosa* de 97,5% em crianças com até 3 anos de idade evidenciados através da combinação de cultura mais sorologia positiva para *P. aeruginosa*.

Cepas de *Staphylococcus aureus* oxacilina–resistentes (MRSA) estão sendo observadas com frequência aumentada em pacientes com FC, com alguns centros relatando até 20% dos isolados com esta característica. Estudos epidemiológicos moleculares mostram que os pacientes de FC com MRSA frequentemente adquirem a cepa quando são hospitalizados. Alguns pacientes tornam-se cronicamente infectados com este organismo, enquanto outros podem ser infectados transitoriamente (MILLER e GILLIGAN, 2003). O impacto clínico de MRSA em pacientes com FC permanece incerto. Crianças com MRSA recebem mais antibióticos intravenosos, e apresentam piora radiológica em relação ao basal, o que sugere aumento da gravidade global da doença. Adultos com MRSA apresentam pior função pulmonar com períodos breves de colonização (SAIMAN e SIEGEL, 2004). Mais recentemente tem sido observado um maior risco de mortalidade em pacientes cronicamente infectados por MRSA (MUHLEBACH *et al.*, 2011).

3.5.1.1 Fatores de virulência

A crescente viscosidade das secreções aéreas e o reduzido *clearance* mucociliar podem ser significativos, mas não explicam a seletividade para a colonização/infecção por *S. aureus*. Foi observado, além disso, que *S. aureus* da FC também se ligam mais intensamente às células epiteliais nasais e bucais. Esses resultados indicam que existem cepas de *S. aureus* que aumentaram a capacidade de afinidade em atingir as células com deficiência da proteína CFTR, e não que tais células tenham receptores seletivos para *S. aureus* (BARTH e PITT, 1998).

Além da aderência, *S. aureus* dispõe de uma variedade de outros fatores de virulência que evadem a resposta do hospedeiro, como: leucocidinas, catalase, proteína A, hemolisinas, coagulase e várias outras toxinas que contribuem para sua patogenicidade (DORING *et al.*, 2000). A maioria como *S. aureus* causa dano no tecido pulmonar não está bem definida, porém na era pré-antibiótica a maioria das mortes era causada devido dano pulmonar significativo causado por *S. aureus* evidenciado nas autópsias. (OLIVER *et al.*, 2009).

3.5.1.2 Transmissão

A transmissão paciente-paciente pode ocorrer com *S. aureus*. Tanto a transmissão de cepas oxacilina- sensíveis (MSSA) ou de cepas oxacilina resistentes (MRSA) ocorre entre pacientes com FC ou até sem FC. MRSA é mais comum entre pacientes hospitalizados (SAIMAN e SIEGEL, 2004).

3.5.2 *Haemophilus influenzae*

Haemophilus Influenzae (*H. influenzae*) é uma bactéria gram-negativa presente na nasofaringe de até 15% de crianças não imunizadas (HAUSDORFF *et al.*, 2007; ULANOVA e TSANG, 2009). É a terceira bactéria mais isolada do trato respiratório de pacientes com FC e normalmente pode não ser recuperada em pacientes adultos (MILLER e GILLIGAN, 2003). Essa bactéria é primeiramente, mas não exclusivamente, encontrada em crianças

com FC (GILLIGAN, 1991). Apresenta uma taxa de incidência entre crianças menores de 5 anos que varia de 20 a 60 casos/100.000 por ano (HAUSDORFF *et al.*, 2007).

Román e colaboradores (2004) estudaram o perfil de colonização por *H. influenzae* de 27 pacientes durante 7 anos (média de 41 meses de observação por paciente), e verificaram a persistência da colonização por cepas de *H. influenzae* mesmo com a utilização de antimicrobianos adequados. Este perfil de multirresistência parece estar relacionado com cepas hipermutantes, semelhante a *P. aeruginosa* (OLIVER *et al.*, 2009; LIPUMA, 2010).

Muitas vezes a colonização por *H. influenzae* inicia no trato respiratório superior. Dados relacionados ao potencial patogênico dessa bactéria virtualmente não existem, mesmo assim muitos clínicos consideram a possibilidade desse micro-organismo colonizar os pulmões, de maneira significativa o bastante para justificar a terapia (LYCZAK *et al.*, 2002), pois muitas vezes tem demonstrado um perfil de resistência aumentado ao tratamento antimicrobiano (CARDINES *et al.*, 2012).

3.5.3 *Pseudomonas aeruginosa*

3.5.3.1 Fatores de virulência

As bactérias do gênero *Pseudomonas* são aeróbicas, não formadoras de esporos, bacilos gram-negativos retos ou levemente curvos. São móveis devido a um ou mais flagelos polares. Utilizam glicose e outros carboidratos de modo oxidativo e são citocromo-oxidase positivos. A infecção por *P. aeruginosa* prevalece particularmente em pacientes com feridas de queimaduras, FC, leucemia aguda, transplante de órgãos. Produz várias substâncias que se acredita tenha a capacidade de aumentar a colonização e a infecção dos tecidos do hospedeiro. Essas substâncias, juntamente com uma variedade de fatores de virulência, incluindo lipopolissacarídeo (LPS), exotoxina A, leucocidina, viscosidade extracelular, proteases, fosfolipase e várias outras enzimas (Quadro 2) tornam *P. aeruginosa* a bactéria de maior importância clínica na FC (KONEMAN, 2008).

Fatores de Virulência	Atividade Biológica
Alginato	Polissacarídeo capsular que permite a aderência das bactérias infectantes às superfícies epiteliais pulmonares formando biofilmes, os quais, por sua vez, protegem as bactérias contra a ação dos antibióticos e do sistema imunológico do organismo
Pili (fímbrias)	Apêndices da superfície celular da bactéria que permitem a sua aderência aos receptores do gangliosídeo GM-1, presentes na superfície das células epiteliais do hospedeiro
Neuraminidase	Remove os resíduos de ácido siálico dos receptores de gangliosídeo GM-1, facilitando a ligação dos pili.
Lipopolissacarídeo	Produce endotoxina e causa síndrome de sepse: febre, choque, oligúria, leucopenia ou leucocitose, coagulação intravascular disseminada, anormalidades metabólicas
Exotoxina A	Destruição tecidual, inibição da síntese de proteínas, interrompe a atividade celular e a resposta dos macrófagos
Enterotoxina	Interrompe a atividade gastrointestinal normal, resultando em diarreia
Exoenzima S	Inibe a síntese de proteínas
Fosfolipase C	Destroi a membrana citoplasmática; destrói o surfactante pulmonar; inativa as opsoninas
Elastase	Cliva as imunoglobulinas e os componentes do complemento anula a atividade dos neutrófilos
Leucocidina	Inibe a função dos neutrófilos e dos linfócitos
Piocianinas	Suprime outras bactérias e anula a atividade ciliar respiratória; causa lesão oxidativa dos tecidos, particularmente dos tecidos oxigenados, como o pulmão.

QUADRO 2 - FATORES DE VIRULÊNCIA DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

FONTE: KONEMAN (2008)

3.5.3.2 Patogenia

A infecção crônica por *P. aeruginosa* é a principal responsável pelo declínio progressivo da função pulmonar e também pela mortalidade dos pacientes de FC. Infecção pulmonar crônica segundo LEE *et al*, (2003) refere-se à presença de *P. aeruginosa* na árvore brônquica, por 6 meses, no mínimo, com presença de sinais diretos (inflamação, febre, etc) e indiretos (resposta de anticorpos específicos). O dano à superfície epitelial e o bloqueio das vias aéreas, provocados pela bactéria, vão dificultando progressivamente a passagem do ar, o que resulta em diminuição da função pulmonar. A intensa inflamação que acompanha o processo infeccioso caracteriza-se por sequestro de neutrófilos nas vias aéreas com consequente *clearance* mucociliar deficiente. Na década passada, a contribuição proeminente da inflamação para a destruição tissular e perda da função pulmonar veio à tona em vários estudos (DOUGLAS *et al.*, 2009). Terapias anti-inflamatórias passaram então a demonstrar melhora clínica nos pacientes infectados (DALCIN e SILVA, 2008) embora com reações adversas preocupantes devido ao tratamento prolongado (LYCZAK *et al.*, 2002).

Estudos mostram que a inflamação e a infecção bacteriana podem iniciar em idade bem precoce, antes mesmo dos sintomas. A prevalência de infecção varia significativamente com a idade: aproximadamente 25% das crianças até 5 anos e 80% dos adultos encontram-se infectados por esta bactéria (GOSS e BURNS, 2006). RAZVI *et al*, (2009) observaram em pacientes FC nos EUA um significativo aumento da prevalência de infecção por *P. aeruginosa* em crianças de 1 ano de idade e também entre 2 e 5 anos de idade. A colonização crônica precoce por *P. aeruginosa* antes da puberdade é fator de pior prognóstico. Em pacientes cuja cronificação da infecção se estabeleceu nos primeiros 5 anos de vida, 20% deles viveram até os 16 anos de idade, enquanto que naqueles em que a cronificação se deu após os 5 anos de idade, a sobrevida foi além dos 16 anos em 95% dos casos (REIS e DAMACENO, 1998).

Crianças infectadas por *P. aeruginosa* apresentam pior função pulmonar, pior *escore* radiológico de tórax e redução de sobrevida em 10 anos

se comparadas com crianças não infectadas por *P. aeruginosa* (SAIMAN e SIEGEL, 2004).

3.5.3.3 Fenótipo mucoide

Inicialmente a colonização do trato respiratório se produz por morfotipos não mucoides de *P. aeruginosa*, geralmente sensíveis a antibióticos, que apresentam baixa densidade bacteriana (OLIVER *et al.*, 2009). Posteriormente, devido a grande plasticidade fenotípica e genotípica, é possível sua manutenção e adaptação dentro do pulmão de pacientes com FC com o estabelecimento da infecção crônica. Dentre as características de adaptação, destaca-se o fenótipo mucoide (MUC), consequente à hiperprodução de um polissacarídeo denominado alginato (MARQUES, 2011). Uma vez estabelecida a infecção com fenótipo mucoide, inicia-se um quadro de infecção crônica dificultando sua erradicação (LIPUMA, 2010). O fenótipo mucoide tem sido associado com aumento da deterioração da função pulmonar e morte precoce devido à maior resistência antimicrobiana à diminuição da eficiência imunológica do paciente (LYCZAK *et al.*, 2002; ROVEDDER *et al.*, 2008).

Cepas mucoides de *P. aeruginosa* crescem como biofilmes nas vias aéreas dos pacientes com FC. Essa habilidade de *P. aeruginosa* crescer como um biofilme, confere maior resistência bacteriana frente à fagocitose e aos antibióticos (LYCZAK *et al.*, 2002; MILLER e GILLIGAN, 2003; GOVAN e DERETIC, 1996).

Esta fase de infecção crônica é marcada por períodos de exacerbações pulmonares (febre, leucocitose, aumento da produção de escarro e diminuição da função pulmonar), que são entremeadas com períodos de relativa quiescência, de duração variável. A função pulmonar continua a declinar, no entanto, pois as cepas infectantes tornam-se cada vez mais resistentes, culminando com falência respiratória (MILLER e GILLIGAN, 2003).

O rápido desenvolvimento da resistência de *P. aeruginosa* pode também estar relacionado com a presença de cepas hipermutáveis, as quais apresentam índices elevados de mutações espontâneas devido a defeitos nos genes envolvidos nos sistemas de reparo do DNA. Segundo vários estudos 30 a 60% dos pacientes estão colonizados por cepas hipermutáveis, sendo estas

extremamente infrequentes (<1%) em pacientes com infecção aguda. A hipermutação aumenta significativamente a resistência antibiótica podendo, portanto desempenhar um papel importante na adaptação bacteriana, requerida para a sua longa persistência no ambiente pulmonar (OLIVER *et al.*, 2009; OLIVER *et al.*, 2000; CIOFU *et al.*, 2005; MACIÁ *et al.*, 2005).

3.5.3.4 Resposta imunológica

A infecção crônica das vias aéreas por *P. aeruginosa* e a exacerbação da resposta inflamatória são claramente os maiores problemas clínicos para o paciente com FC. Durante a última década, a proeminente contribuição da inflamação para a destruição tecidual e perda da função pulmonar tem sido observada em numerosos estudos. Terapias anti-inflamatórias têm mostrado produzir melhora clínica em pacientes infectados, portanto, há interesse em determinar a contribuição da infecção e inflamação precoce para o progresso da doença pulmonar em FC (LYCZAK *et al.*, 2002).

Vários fatores do hospedeiro que representam componentes do sistema imune inato são estimulados por *P. aeruginosa* no pulmão com FC. A falha na defesa pode estar relacionada aos alelos mutantes do gene *CFTR*, no entanto, fatores da bactéria também contribuem aparentemente para a resposta imune inata inadequada na eliminação de *P. aeruginosa* do trato respiratório. A produção de alginato em *P. aeruginosa* também é responsável por reduzir a quimiotaxia dos leucócitos polimorfonucleares (PMN) nos pulmões, que por si próprios inibem a ativação do sistema complemento. As células de *P. aeruginosa* mucoide são inerentemente resistentes à fagocitose por PMN e macrófagos, se comparados com cepas não- mucoides. Tal situação pode ser exacerbada pela ligação da bactéria a fatores do hospedeiro como as mucinas respiratórias ou pelo crescimento em forma de biofilme (LYCZAK *et al.*, 2002).

A patogênese da infecção pulmonar crônica por *P. aeruginosa* na FC tem sido classificada como uma hipersensibilidade do tipo III, caracterizada pela produção de anticorpos específicos contra antígenos bacterianos e de ativação de neutrófilos. Os neutrófilos em decomposição formam grandes áreas de pus ao redor das bactérias persistentes, que podem conduzir à

obstrução total das vias aéreas na FC. A liberação de altas concentrações extracelulares de serino proteinases lisossomais excede a capacidade das antiproteinases endógenas. A proteólise progressiva de múltiplas vias de defesa, em adição à destruição dos tecidos endobrônquicos, pode ser responsável pela significativa redução na expectativa de vida em pacientes com FC (DORING *et al.*, 2000).

Uma vez estabelecida, a infecção por *P. aeruginosa* nas vias aéreas não pode ser erradicada pelo uso de antibióticos que apenas reduzem o número de colônias mas pela combinação de medicamentos que devem ser instituídos precoce e agressivamente. A alta resistência antibiótica é provavelmente devido à baixa penetração do antimicrobiano nas rolhas de muco, ao rápido desenvolvimento de cepas mutantes, e à formação de biofilmes (RATJEN e DORING, 2003).

3.5.3.5 Transmissão

Vários estudos demonstraram que pacientes com FC infectados com *P. aeruginosa* normalmente abrigam estirpes distintas, presumivelmente adquiridas no ambiente natural (LIPUMA, 2010). Os pacientes FC podem adquirir a bactéria através de fontes ambientais como: piscinas, hidroterapias, brinquedos (BARTH e PITT, 1998; SAIMAM e SIEGEL, 2004). Embora a transmissão de estirpes entre irmãos tenha sido bem documentada, o risco de propagação de paciente para paciente foi considerado baixo (LIPUMA, 2010).

Tablan *et al* (1987) estudaram dois diferentes centros de tratamento para FC tentando entender a epidemiologia da infecção por *P. aeruginosa*. Eles observaram um risco aumentado de colonização/infecção por *P. aeruginosa* em pacientes com doença pulmonar grave, entre irmãos, pacientes com maior idade e casos de hospitalizações prévias. O aumento do risco de colonização entre irmãos é por transmissão pessoa a pessoa. Thomassen *et al*, (1986) reportaram uma diminuição importante de colonização/infecção em suas instituições quando utilizaram políticas de segregação dos pacientes colonizados e não colonizados por *P. aeruginosa*. Foi observado que no ano anterior à utilização da precaução de contato entre colonizados e não

colonizados a incidência de *P. aeruginosa* era de 8,2%, e depois da instituição das medidas de controle de infecção a incidência caiu para 1,7%. Estes dados suportam o papel de transmissão pessoa a pessoa (GILLIGAN, 1991).

Smith *et al* (1993), no entanto, chegaram à conclusão que as políticas de segregação de pacientes colonizados e não colonizados nos centros de tratamento para FC e dentro do ambiente hospitalar não são suficientes para diminuir o risco de contaminação por *P. aeruginosa* é necessária a conscientização de que o contato social também apresenta importante papel no aumento do risco de colonização pela bactéria. Políticas de segregação destinadas a reduzir a propagação da infecção na comunidade FC precisam abranger também os cuidados com os contatos fora do ambiente hospitalar.

3.5.4 Complexo *Burkholderia cepacia* (cBc)

Burkholderia cepacia tem sido considerada um importante patógeno emergente em FC. A primeira descrição fitopatogênica foi feita em 1950 por Burkholder, quando foi denominada como *Pseudomonas cepacia* (BARTH e PITT, 1998), porém apenas no início dos anos 80 foi reconhecida como um importante patógeno oportunista entre pacientes FC. A infecção pulmonar com cBc é geralmente crônica, refratária à terapia antimicrobiana, e associa-se com aumento dos casos de morbidade e mortalidade. De fato, existe uma significativa proporção de pacientes com FC que evoluem rápida e progressivamente para casos de pneumonia necrotizante depois da aquisição da cBc (LIPUMA *et al.*, 2001; PRETO *et al.*, 2013; OLIVER *et al.*, 2009).

Estudos subsequentes mostraram que cBc inclui 17 variantes genômicas ou espécies genômicas (fenotipicamente similares, geneticamente distintas), sendo as espécies mais prevalentes *B. cenocepacia* (genomovar III) e *B. multivorans* (genomovar II), que juntas representam 85% das infecções pelo cBc sendo *B. cenocepacia* responsável por aproximadamente 50% dos casos (LIPUMA, 2010; MILLER e GILLIGAN, 2003).

As 17 espécies genômicas do cBc são: *B. cepacia* (genomovar I); *B. multivorans* (genomovar II); *B. cenocepacia* (genomovar III); *B. stabilis* (genomovar IV); *B. vietnamiensis* (genomovar V); *B. dolosa* (genomovar VI); *B.*

ambifaria (genomovar VII); *B. anthina* (genomovar VIII); *B. pyrrocinia* (genomovar IX); *B. ubonensis*; *B. lattens*; *B. diffusa*; *B. arboris*; *B. seminalis*; *B. Metallica*; *B. contaminans*; *B. lata* (LIPUMA, 2010). Dentre as espécies isoladas em FC destaca-se *B. cenocepacia* (genomovar III), considerada um dos patógenos mais graves, pois frequentemente está associada com redução de sobrevida e alto risco de desenvolvimento da "síndrome cepacia". Esta espécie tem sido associada a elevadas taxas de morbidade e mortalidade, existindo algumas evidências de que estirpes pertencentes a esta espécie poderão ser mais virulentas e/ou transmissíveis (CORREIA *et al.*, 2008; DREVINEK e MAHENTHIRALINGAM, 2010). *B. multivorans* (genomovar II) está também associada a colonizações/ infecções crônicas (CORREIA *et al.*, 2008).

Existe heterogeneidade na deterioração pulmonar dos pacientes FC colonizados/infectados pelo cBc, por vezes evoluindo de forma fulminante que ocorre em 30% dos casos (CORREIA *et al.*, 2008). A "síndrome cepacia" caracteriza-se por pneumonia necrotizante com febre, bacteremia, elevação da velocidade de sedimentação de eritrócitos e leucocitose, que culminam em uma rápida e fatal deterioração clínica (GOVAN e DERETIC, 1996). Em outras situações a infecção por cBc não tem diferido daquelas observadas por cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes (REIS e DAMACENO, 1998).

A infecção com o cBc pode ter consequências devastadoras para os pacientes com FC, sendo imprescindível a correta identificação laboratorial deste complexo de bactérias nas amostras de pacientes FC para o adequado tratamento e prevenção de transmissão entre pacientes (MILLER e GILLIGAN, 2003).

Atualmente utilizam - se meios seletivos para o isolamento e identificação do cBc com o objetivo de inibir o crescimento de outros micro-organismos de crescimento rápido como *P. aeruginosa*, que poderiam mascarar a presença do cBc nas culturas dos pacientes FC. (COENYE *et al.*, 2001; MILLER e GILLIGAN, 2003). Além da identificação do complexo e dos genomovares, deve ser feita a diferenciação entre o complexo e outros organismos fenotipicamente similares, tais como *B. gladioli*, *Ralstonia* spp. e *Pandoraea* spp (MILLER e GILLIGAN, 2003).

3.5.4.1 Transmissão e vias de aquisição

Bactérias do cBc são encontradas no solo e na rizosfera de plantas (CORREIA *et al.*, 2008).

Acredita-se que a infecção por cBc se dissemina por contato direto paciente-paciente, por transmissão nosocomial ou por aquisição a partir do meio ambiente, logo é possível a transmissão tanto dentro como fora do ambiente hospitalar, no meio social (LYCZAK *et al.*, 2002; BARTH e PITT, 1998; SPEERT *et al.*, 2002). Frente a esta condição alguns centros de tratamento para FC têm adotado uma política de segregação dos pacientes colonizados com *B. cepacia* dos não colonizados, que são atendidos em dias e horários diferentes para prevenir o risco de transmissão do cBc entre pacientes FC (MILLER e GILLIGAN, 2003; SAIMAN e SIEGEL, 2004).

3.5.5 *Streptococcus pneumoniae*

É um micro-organismo ocasionalmente isolado nas culturas de pacientes FC, geralmente presente nas etapas iniciais da enfermidade, e que não persiste por muito tempo na doença pulmonar. Quanto ao aspecto patogênico *S. pneumoniae* se comporta como *S. aureus*, que é capaz de aderir-se à superfície mucosa, favorecendo as infecções broncopulmonares crônicas (GILLIGAN, 1991; OLIVER *et al.*, 2009).

3.5.6 Micobactérias

Existem mais de 175 espécies no gênero *Mycobacterium*. A maioria vive livremente na água e no solo, não são patogênicas ao ser humano (LIPUMA, 2010). Os pacientes FC, porém, tem um maior risco de sofrer colonização/ infecção respiratória por micobactérias não tuberculosas (MNT), provavelmente devido a bronquiectasias e infecções crônicas mais recorrentes (OLIVER *et al.*, 2009). O papel destas micobactérias em doença pulmonar crônica não foi profundamente estudado. Estudos preliminares têm sugerido que em alguns

pacientes as micobactérias estão associadas com um declínio da função pulmonar (GILLIGAN, 1991).

Fatores de risco para a colonização e infecção por esses patógenos incluem o uso de antibióticos intravenosos e nebulizadores (SAIMAN e SIEGEL, 2004).

3.5.7. *Stenotrophomonas maltophilia* e *Achromobacter xylosoxidans*

Stenotrophomonas maltophilia (*S. maltophilia*) e *Achromobacter xylosoxidans* (*A. xylosoxidans*) são bacilos gram-negativos não fermentadores, reconhecidos como patógenos oportunistas, resistentes à maioria dos antimicrobianos (OLIVER *et al.*, 2009; SPILKER *et al.*, 2013). Estão sendo encontrados com maior frequência, principalmente na população adulta de pacientes com FC. O papel de qualquer desses agentes na doença pulmonar, porém, não foi ainda determinado (MILLER e GILLIGAN, 2003).

Fatores como o uso prolongado de antimicrobianos predispõem à colonização por estes micro-organismos (SAIMAN e SIEGEL, 2004). Hospitalizações e contato com pessoas contaminadas parecem ter menor impacto na transmissibilidade desses agentes, embora tenham sido relatados alguns casos de pacientes colonizados com a mesma cepa pertencentes ao mesmo centro de tratamento para FC (OLIVER *et al.*, 2009; LIPUMA, 2010).

A prevalência desses micro-organismos tem aumentado no decorrer dos anos, porém com diferenças entre os centros de tratamento de pacientes FC (OLIVER *et al.*, 2009). Em 1996 havia 4% de pacientes colonizados com estes micro-organismos, já em 2005 houve um aumento para 15,8% na faixa etária entre 11 a 17 anos. Estas variações da frequência de colonização podem também ser decorrentes de métodos incorretos para identificação microbiológica. Alguns estudos demonstraram que ambas bactérias podem ser identificadas erroneamente pelos laboratórios clínicos como cBc (McMenamin *et al.*, 2000; SAIMAN *et al.*, 2001). A identificação é complicada parcialmente pelo crescimento de algumas cepas de *S. maltophilia* e *Achromobacter* spp. em meios seletivos para o complexo *Burkholderia cepacia*. O teste de suscetibilidade deve ser feito por meio de um método por diluição, uma vez que

erros importantes podem ser vistos quando realizados por disco-difusão usando os pontos de corte para *P. aeruginosa* (MILLER e GILLIGAN, 2003).

A patogenicidade desses micro-organismos não foi ainda estabelecida, embora haja associação de *S. maltophilia* e *A. xylosoxidans* com exacerbações pulmonares (SAIMAN e SIEGEL, 2004). Estudos recentes têm demonstrado que *A. xylosoxidans* é clinicamente um importante patógeno que causa inflamação e infecção crônica com deterioração clínica similar à encontrada em infecções por *P. aeruginosa* (HANSEN *et al*, 2010; AMOUREUX *et al*, 2013). Alguns clínicos têm interesse em saber se estão presentes para erradicá-los através de terapia antibiótica (MILLER e GILLIGAN, 2003; HANSEN *et al*, 2010; AMOUREUX *et al*, 2013).

Ao contrario das infecções por cBc e *P. aeruginosa* que geralmente são crônicas, a infecção por *S. maltophilia* e *A. xylosoxidans* é transitória (LIPUMA, 2010).

3.5.8. Fungos

3.5.8.1 *Aspergillus fumigatus*

O principal agente fúngico responsável por colonização pulmonar em pacientes com FC é *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*). Especificamente, este organismo causa aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA) (GILLIGAN, 1991), uma doença pulmonar de hipersensibilidade mediada por uma resposta inflamatória alérgica de fase tardia a certos antígenos de *A. fumigatus*. Quando presente esta resposta é considerada um fator complicador da FC e pode levar a uma evolução desfavorável do quadro pulmonar (ALMEIDA *et al.*, 2006). Apresenta uma prevalência entre 2 a 10% em pacientes FC, com a maior frequência em crianças acima de 6 anos ou adultos jovens (OLIVER *et al.*, 2009).

É um patógeno que causa uma variedade de doenças pulmonares, não restritas aos pacientes FC, mas relacionadas a casos de imunossupressão ou de hipersensibilidade. A colonização por este fungo pode resultar em infecção localizada ou disseminada e pode induzir a uma resposta inflamatória aguda ou granulomatosa crônica, ambas podendo levar à destruição do tecido pulmonar

adjacente, levando a uma progressiva deterioração da função pulmonar com aumento de morbidade e mortalidade (LYCZAK *et al.*, 2002; ASNER *et al.*, 2012; ETHERINGTON *et al.*, 2014).

Fungos são frequentemente recuperados de amostras respiratórias, especialmente com o uso de meio seletivo para cBc, que facilita o crescimento fúngico. O diagnóstico dessa entidade porém é baseado mais no critério clínico do que na recuperação do micro-organismo (MILLER e GILLIGAN, 2003), pois há uma grande variedade de parâmetros a serem observados como: a presença de bronco-constricção, infiltrados pulmonares, eosinofilia, broncoespasmos com sibilos, aumento dos níveis de IgE (imunoglobulina E) contra antígenos de *A. fumigatus*, reatividade cutânea imediata ao *A. fumigatus*, anticorpos (precipitinas), obstrução brônquica, inflamação e impactação mucoide levando a quadros de bronquiectasias e fibroses, dificultando assim o diagnóstico desta entidade (OLIVER *et al.*, 2009; KALIL *et al.*, 2006; CARNEIRO *et al.*, 2008; GILLIGAN, 1991).

Infecções fúngicas podem ser adquiridas por exposição ambiental e não podem ser totalmente prevenidas. Altas concentrações de esporos no ambiente podem ocorrer durante construções, vazamentos de água, e jardinagens como ao cortar a grama. Cuidados corretos devem ser tomados com a exposição de pacientes vulneráveis, principalmente os que realizaram transplante de órgãos sólidos (SAIMAN e SIEGEL, 2004).

3.5.8.2 Leveduras

Leveduras como *Candida albicans* é normalmente endógena a partir da própria microbiota dos pacientes, e frequentemente coloniza a árvore respiratória dos pacientes FC que recebem tratamento prolongado com antibióticos e glicocorticóides. O papel que este organismo desempenha na doença pulmonar dos pacientes FC, no entanto, não está bem definido (GILLIGAN, 1991; OLIVER *et al.*, 2009).

3.6 CULTURA

3.6.1 Coleta de amostras clínicas

A infecção pulmonar é a causa mais comum de morbidade e mortalidade na FC (BURNS *et al.*, 2001; BRAID *et al.*, 2012). Amostras de secreção de vias aéreas inferiores são consideradas essenciais para determinar a etiologia infecciosa de exacerbações pulmonares na FC. A amostra mais facilmente obtida é o escarro obtido com expectoração. Alguns indivíduos com FC, no entanto são incapazes de expectorar, isto é muito comum em crianças pequenas nas quais o lavado bronco-alveolar (LBA) é considerado um método de referência para coletar amostras de vias aéreas inferiores; entretanto é um método invasivo e perigoso para ser usado como rotina de coleta de amostras pois geralmente necessita de anestesia geral em crianças (GOSS e BURNS, 2006; BURNS e ROLAIN, 2014).

Em pacientes jovens demais para expectorar, o único método não invasivo para cultivar secreções respiratórias é a obtenção de *swabs* de orofaringe (ARMSTRONG *et al.*, 1996), que frequentemente refletem a microbiota do trato respiratório inferior, enquanto as culturas de escarro predizem acuradamente a bactéria nos pulmões (THOMASSEN *et al.*, 1984; GILLIGAN, 1991). Na realidade, as culturas de orofaringe detectam micro-organismos, inclusive os potencialmente patogênicos, presentes na garganta e não necessariamente nos pulmões (LYCZAK *et al.*, 2002) logo são mais propensos a conter microbiota bucal e menos sensíveis à detecção de *S. aureus* e *P. aeruginosa* em comparação com culturas de vias aéreas inferiores (escarro e LBA) (BURNS e ROLAIN, 2014).

Durante a década passada, diversos estudos mostraram que podem haver diferenças importantes relacionadas à detecção de patógenos da FC nas vias aéreas inferiores, comparando os resultados de culturas de orofaringe com aqueles obtidos usando LBA, particularmente em pacientes jovens com FC. O estudo de Burns *et al.* (2001) entretanto, comparou amostras de LBA com culturas de orofaringe e observou que duas culturas de orofaringe (vias aéreas superiores) realizadas a cada 3 meses utilizando técnica correta podem ser úteis para prever a colonização das vias aéreas inferiores em crianças não expectorantes.

Alguns estudos indicam que os patógenos da FC podem estar presentes nas vias aéreas inferiores, mas não são confiavelmente detectados por culturas de orofaringe, e outros dados sugerem que culturas de garganta positivas não são necessariamente indicativas de patógenos no pulmões (LYCZAK *et al.*, 2002). É importante lembrar também que as bactérias não estão uniformemente distribuídas no escarro, portanto, uma correta identificação dos micro-organismos predominantes depende da amostra da área representativa da infecção e da não contaminação por bactérias da orofaringe (WONG *et al.*, 1984). Apesar do LBA ser considerado referência para coleta de amostras de vias aéreas inferiores, não pode refletir com precisão o que está presente no pulmão do FC, pois a amostragem é realizada de forma regional não detectando todas as áreas pulmonares. Além disso, não pode detectar as bactérias aderidas em tampões mucosos (BURNS *et al.*, 2001).

O importante é que a rápida caracterização da microbiota bacteriana pode propiciar condições para tratamento precoce, melhorando a sobrevida e evitando casos de transmissão entre pacientes, sendo a antibioticoterapia considerada parte essencial do tratamento (KOLAK *et al.*, 2003; RENDERS *et al.*, 2001).

3.6.2 Processamento das amostras para cultura

As culturas de amostras do trato respiratório de pacientes com FC tem como objetivo fornecer maiores quantidades de amostra por um método para isolamento dos microrganismos associados com a doença pulmonar nestes pacientes. O número de espécies microbianas associadas com a doença pulmonar na FC é relativamente limitado. Os principais micro-organismos isolados são: *Pseudomonas aeruginosa* mucóide e não mucóide, *Staphylococcus aureus*, complexo *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Haemophilus influenzae* entre outros (GILLIGAN, 1991).

A coloração do Gram é de pouca utilidade na avaliação de amostras de orofaringe, devido à frequente ausência de sinais inflamatórios, no entanto os meios recomendados pela maioria dos autores para cultivo de amostras de orofaringe de pacientes de FC são: ágar-sangue de carneiro ou de cavalo (AS); ágar-chocolate para isolamento de *Haemophilus influenzae* (ACH); ágar

manitol salgado para isolamento de *Staphylococcus aureus* (MSA); ágar MacConkey para isolamento de *Pseudomonas aeruginosa* (MC); ágar seletivo para isolamento de *Burkholderia cepacia* (BCSA) (GILLIGAN, 1991; CYSTIC FIBROSIS TRUST, 2002, BURNS, 1998).

3.7 TRATAMENTO DA FC

Apesar dos avanços no conhecimento da doença, ainda não existe tratamento específico para a FC. Devido ao seu caráter multissistêmico e crônico, o tratamento deve ser realizado em centros de referência com equipe multidisciplinar (CASTRO e FIRMIDA, 2011). Pacientes com boa adesão ao tratamento apresentam uma sobrevida média que vem aumentando, passando de 2 anos, em 1950, para 30-40 anos atualmente. Deve-se estabelecer um programa de tratamento contínuo, visando a profilaxia das infecções e das complicações, deve ser iniciado o mais precocemente possível e ser individualizado levando-se em conta a gravidade e os órgãos acometidos. O tratamento precoce retarda a progressão das lesões pulmonares, melhora o prognóstico e aumenta a sobrevida. Na tabela 3 estão os principais objetivos do tratamento da FC (RIBEIRO *et al.*, 2002).

TABELA 3- OBJETIVOS GERAIS DO TRATAMENTO DA FC

-
- Educação continuada do paciente e dos familiares em relação à doença
 - Profilaxia das infecções com um programa vacinal completo
 - Detecção precoce e controle da infecção pulmonar
 - Fisioterapia respiratória e melhora da obstrução brônquica
 - Correção da insuficiência pancreática
 - Apoio nutricional, com orientações em relação à dieta e suplementação de vitamina
 - Monitoramento da progressão da doença
 - Monitoramento de complicações
 - Aconselhamento genético familiar
 - Apoio psicológico para os pacientes e familiares
 - Acesso irrestrito às medicações
 - Informações para os pacientes e familiares sobre os avanços nos conhecimentos sobre a FC, mantendo uma atitude otimista em relação à doença.
-

FONTE: RIBEIRO *et al.*, (2002).

A introdução da triagem neonatal para a FC e o diagnóstico nas primeiras semanas de vida permitem a instalação precoce de medidas preventivas, monitoração microbiológica regular da presença de infecção respiratória, e tratamento antibiótico precoce. As infecções crônicas por *S. aureus* e *P. aeruginosa* uma vez estabelecidas são difíceis de erradicar; mas, se tratadas precocemente, ambas as bactérias são eliminadas com sucesso (SANTANA *et al.*, 2003; ALVAREZ *et al.*, 2004; *CYSTIC FIBROSIS TRUST*, 2002).

O tratamento com antibióticos é provavelmente o fator mais importante responsável pela melhora dos pacientes com FC, tanto em termos de sobrevida como em qualidade de vida, embora não haja consenso sobre a antibioticoterapia ideal para o tratamento dos pacientes FC. (MARKS, 1981; SANTOS *et al.*, 2004). Alguns clínicos prescrevem antibióticos de forma intermitente, guiados pelas características clínicas e pela bacteriologia do escarro, enquanto outros sugerem um regime antibiótico contínuo contra *S. aureus*. Outros, ainda, combinam elementos de ambas as abordagens (MARKS, 1981). Há ainda três situações clínicas distintas para a prescrição da antibioticoterapia: primeiro na infecção pulmonar precoce, para retardar o início da colonização crônica (tratamento de erradicação ou descolonização);

segundo, como terapia de manutenção em pacientes cronicamente colonizados por *P. aeruginosa*, para diminuir o declínio da função pulmonar e reduzir a frequência e a morbidade das exacerbações pulmonares; terceiro como tratamento das exacerbações pulmonares periódicas, na tentativa de melhorar os sintomas e retornar a função pulmonar ao seu nível basal (HOFFMANN e PROCIANOY, 2011).

Os antibióticos na FC podem ser administrados pela via oral, via endovenosa (EV), via intramuscular (IM) e, ainda por via inalatória (RIBEIRO *et al.*, 2002). Não há consenso sobre qual método é superior no tratamento dos pacientes FC, sendo necessários futuros estudos utilizando diferentes combinações de vias de administração, dosagens e drogas para se determinar a maior eficácia no tratamento (DORING *et al.*, 2000).

A maioria dos pacientes são colonizados inicialmente com *S. aureus* (KAHL, 2010) ou *H. influenzae*, seguidos de *P. aeruginosa*. Muitos centros de referência em FC tentam erradicar a colonização das vias aéreas por *P. aeruginosa*, com terapia anti-estafilocócica, mesmo na ausência de sintomatologia. Apesar dos benefícios da erradicação precoce da colonização bacteriana das vias aéreas dos pacientes FC serem bem conhecidos, em um estudo retrospectivo a terapia anti-estafilocócica contínua foi associada a uma taxa mais elevada de aquisição de *P. aeruginosa*, especialmente nos primeiros 6 anos de vida (RATJEN *et al.*, 2001). Do mesmo modo, estudo multicêntrico controlado por placebo do uso de cefalexina profilática desde o diagnóstico até a idade de 6 anos, não mostrou benefício sobre a função pulmonar, tendo sido notada incidência maior de *P. aeruginosa* nos pacientes tratados (RATJEN e DORING, 2003). Similarmente o Registro Europeu de Fibrose Cística com 3.219 pacientes FC, demonstrou que a terapia profilática contínua anti-estafilocócica aumentou os casos de culturas positivas para *P. aeruginosa* (LYCZAK *et al.*, 2002).

Geralmente é observado um aumento da infecção por *P. aeruginosa* seguido de uma diminuição de infecção por *S. aureus* com a idade, ou seja, com o avançar da idade ocorre uma maior frequência de colonização por *P. aeruginosa* tornando este micro-organismo o principal patógeno na FC (Gráfico 1) (PAIXÃO *et al.*, 2010). Após período inicial de colonização transitória com cepas não mucoides de *P. aeruginosa*, os pacientes não tratados geralmente

tornam-se crônicos e infectados por cepas mucoides. Mesmo com esquemas antibióticos agressivos, esta modalidade da bactéria não pode ser erradicada, provavelmente por baixa penetração dos antibióticos nas rolhas de muco, formação de biofilmes, rápido desenvolvimento de cepas mutantes, com aumento da resistência aos antibióticos e maior permanência no sistema respiratório dos pacientes FC (RATJEN e DORING, 2003; PINHEIRO et al., 2008).

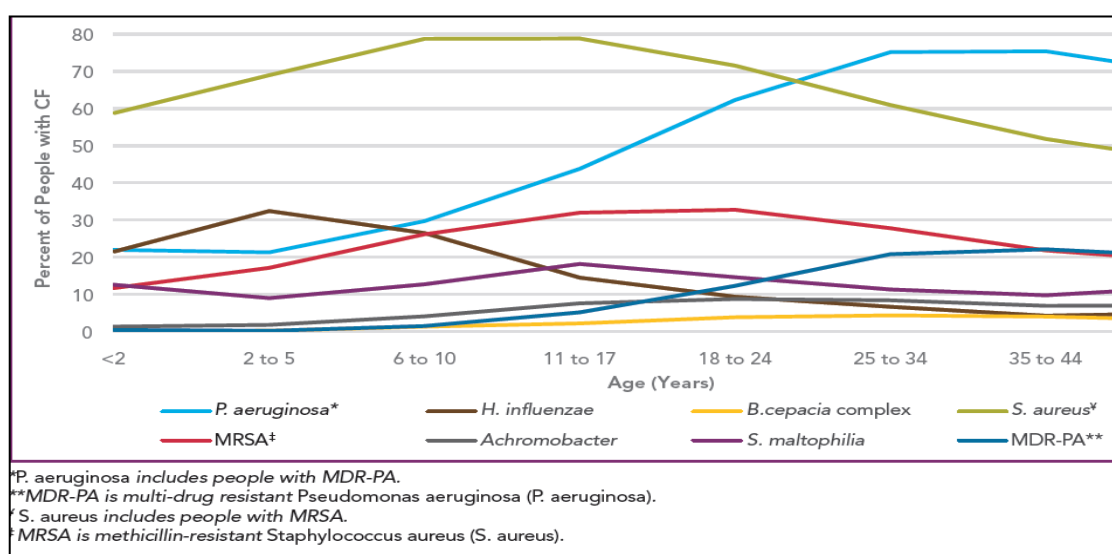


GRÁFICO 1 – INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS X IDADE

FONTE: CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION (2012)

O aumento da prevalência de MRSA nos pacientes pediátricos pode refletir o uso generalizado de flucloxacilina para o tratamento da infecção com *S. aureus* de acordo com MIALI et al. (2001), o significado clínico da infecção por MRSA na FC ainda não foi estabelecido (REITER et al., 2010). Um estudo analisou crianças com a doença durante um período de 7 anos, cujas culturas de secreções respiratórias apresentavam MRSA. Os autores concluíram que a infecção por esse tipo de bactéria em crianças com FC não afeta significativamente a função respiratória, mas tem um efeito adverso no crescimento. Estes pacientes requerem antibióticos intravenosos em quantidades significativamente maiores e têm maiores alterações radiológicas (SOUZA et al., 2006).

Em resumo, a terapia com antibióticos para pacientes FC é dirigida à prevenção, erradicação ou controle de infecções respiratórias. O uso precoce de antibióticos eficazes nestas situações tem diminuído grandemente a morbidade e aumentado a longevidade. Sem tratamento as crianças com FC apresentam risco de infecção precoce e processo inflamatório levando a danos pulmonares e finalmente progredindo para insuficiência respiratória fatal (CYSTIC FIBROSIS TRUST, 2009).

Para evitar quadros graves com possíveis evoluções desfavoráveis é necessário o conhecimento dos principais sinais e sintomas que indicam um quadro de exacerbação pulmonar na FC. Os 10 principais sinais e sintomas são: aumento da tosse, aumento da produção de escarro, febre, anorexia e perda de peso, absenteísmo na escola ou no trabalho, diminuição da tolerância aos exercícios, diminuição na saturação de oxigênio, novos achados na ausculta pulmonar, novos achados à radiografia de tórax e redução de mais de 10% no VEF1 (RIBEIRO *et al.*, 2002).

3.7.1 Terapia de reposição enzimática

Com a obstrução dos dutos pancreáticos há o impedimento da chegada das enzimas pancreáticas até o duodeno. Tão logo fique caracterizada a insuficiência pancreática, deve-se iniciar uma terapia de reposição enzimática, evitando assim a instalação ou agravamento da desnutrição (RIBEIRO *et al.*, 2002). Há associação entre desnutrição e deterioração da função pulmonar. Dessa maneira, é consensual que um adequado suporte nutricional tem uma contribuição fundamental para um melhor prognóstico da FC (DALCIN e SILVA, 2008).

3.7.2 Fisioterapia

A fisioterapia respiratória ajuda a retardar a progressão natural da FC com medidas que visam melhorar o *clearance* mucociliar, melhorar a ventilação pulmonar e promover qualidade de vida (CASTRO e FIRMIDA, 2011), através de técnicas de limpeza das vias aéreas que é considerada um dos grandes

pilares do tratamento de pacientes FC (HURT e BILTON, 2012). Várias técnicas fisioterápicas estão disponíveis. As técnicas convencionais incluem percussão torácica, drenagem postural (DALCIN e SILVA, 2008) em diferentes posições anatômicas para a remoção das secreções através do favorecimento da ação da gravidade.

O sucesso e a adesão do paciente à fisioterapia dependem da capacidade do fisioterapeuta de ajustar as técnicas à necessidade dos pacientes. Não se deve eleger uma técnica como sendo a melhor de todas, pois o êxito do tratamento depende da associação de técnicas e recursos somados a monitoração frequente da terapia (RIBEIRO *et al.*, 2002)

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho recebeu a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná sob o número: 2290.184\2010-07; trata-se de estudo retrospectivo de análise de dados registrados no sistema informatizado do HC – UFPR e acessados através do serviço de Alergia, Imunologia e Pneumologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

4.1 CASUÍSTICA

Dos 118 pacientes cadastrados no ambulatório de fibrose cística do HC-UFPR, aproximadamente 94 pacientes são acompanhados pelo ambulatório e realizam consultas e exames de rotina. Deste total, 11 pacientes não participaram do programa de triagem neonatal e fizeram diagnóstico tardio de FC, e 83 pacientes foram triados ao nascimento (pacientes nascidos a partir de 2001). Estes 83 pacientes foram ainda classificados em dois grupos, de acordo com a idade no início da avaliação neste estudo (conforme figura 3): 62 pacientes foram avaliados e acompanhados a partir a partir de 2 anos de idade (grupo 1) e 21 pacientes acompanhados e avaliados desde o 1º mês de vida (grupo 2), quanto ao perfil de colonização (presença de cultura positiva para bactérias e ou fungos) do trato respiratório inferior num período de 5 anos de monitoramento (2008-2012).

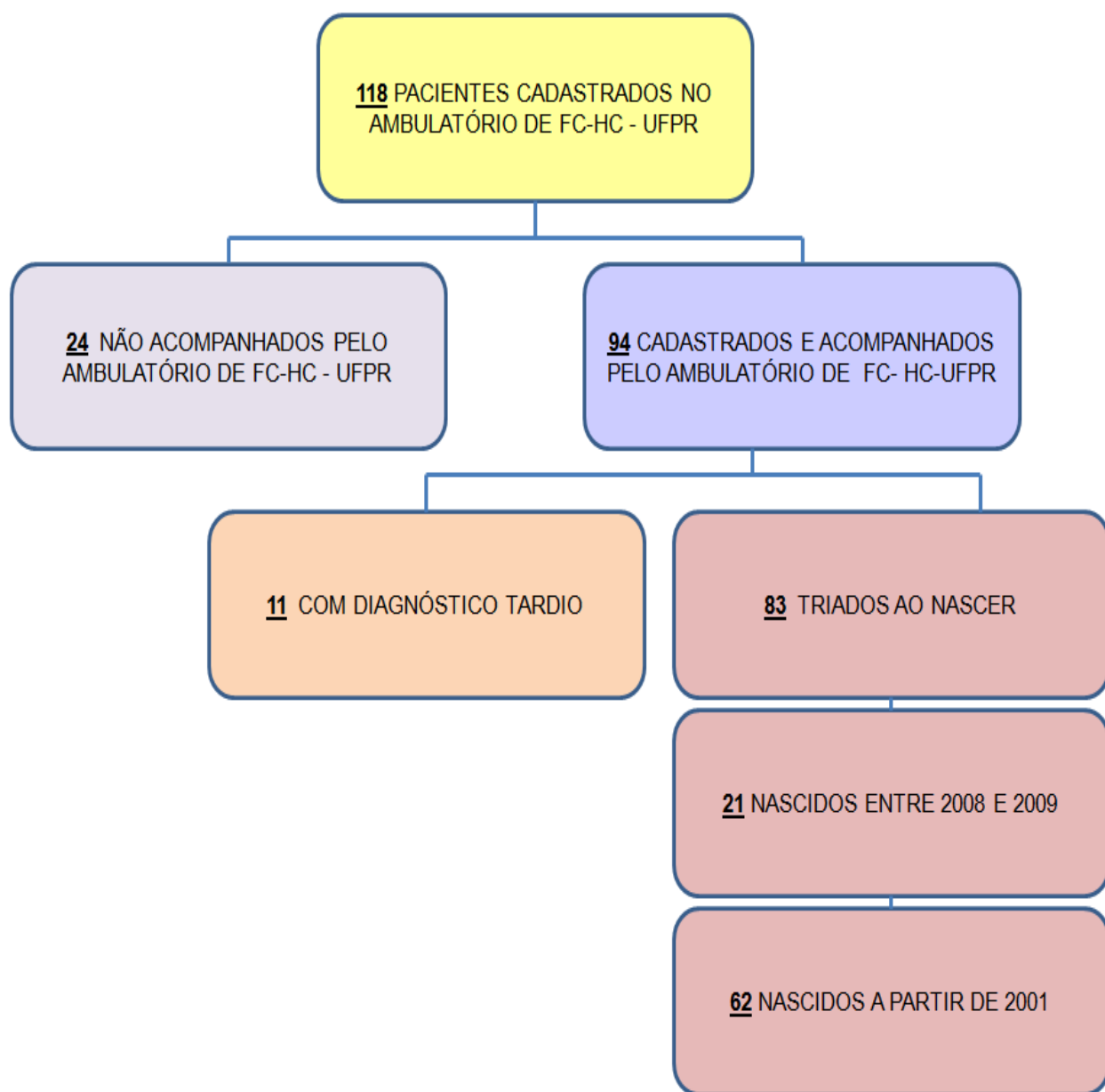


FIGURA 3 - FLUXOGRAMA DOS PACIENTES CADASTRADOS PELO AMBULATÓRIO DE FC DO HC-UFPR.

FONTE: O AUTOR (2014)

4.2 MÉTODOS

Antes da coleta de informações no sistema informatizado do HC, foi obtido o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) assinado pelos responsáveis legais pelos pacientes, os quais foram devidamente esclarecidos quanto à natureza do estudo e os possíveis benefícios advindos da pesquisa.

Os 83 pacientes triados e acompanhados pelo ambulatório de fibrose cística do HC – UFPR realizam exames de cultura rotineiramente a cada três meses ou mais, em busca de possíveis micro-organismos colonizadores capazes de provocar um processo infeccioso pulmonar. Para a realização destes exames é necessária a coleta de escarro ou de *swab* de orofaringe, que geralmente é realizada pelo fisioterapeuta ou enfermeiro do ambulatório de fibrose cística do HC.

Em pacientes pediátricos com dificuldade de expectorar, foram coletados *swabs* de orofaringe que foram acondicionados em tubo estéril contendo 1 ml de tampão PBS com 0,1% de gelatina bacteriológica, com ou sem nebulização prévia utilizando solução de cloreto de sódio hipertônico, e em pacientes com capacidade para tossir as amostras foram coletadas em frasco estéril de boca larga, com um volume de cerca de 3 a 5 mL de escarro obtido por esforço de tosse.

Após as coletas as amostras foram encaminhadas ao laboratório de Bacteriologia e Micologia do HC-UFPR para análise e identificação microbiológica de acordo com protocolo utilizado pela unidade (SOUZA *et al.*, 2006). Desses 83 pacientes acompanhados, foi possível observar a evolução das colonizações microbiológicas nos primeiros anos de vida de 21 pacientes nascidos entre 2008 e 2009.

A coleta de dados foi realizada na base de dados do serviço de Alergia, Imunologia e Pneumologia do HC - UFPR, sendo possível avaliar a evolução do quadro de colonização dos pacientes referentes ao último quinquênio.

Dados como idade, data de inclusão no programa de fibrose cística do HC, gênero, número de culturas positivas e negativas, tipos de micro-organismos isolados, foram analisados através da base de dados do serviço de Alergia, Imunologia e Pneumologia do HC de 83 pacientes pertencentes ao

programa de triagem neonatal que foram monitorados pelo Ambulatório de fibrose cística do Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Paraná no período compreendido pela pesquisa.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Durante o tratamento estatístico utilizou-se o teste de Qui Quadrado para proporções. A média do número de culturas realizadas por paciente foi comparado entre os anos por meio da ANOVA para medidas repetidas, sendo realizado em seguida o teste de acompanhamento de Tukey. Após a realização destas análises, em caso de significâncias estatísticas, foram realizados testes de acompanhamento para verificar quais categorias diferenciavam-se entre si. Tal análise foi realizada por meio do teste de Marascuilo. Dentre os 83 pacientes triados, 21 pacientes nascidos entre 2008 e 2009 foram analisados quanto ao comportamento das colonizações nos primeiros anos de vida para as principais bactérias patogênicas, sendo realizados os mesmos testes estatísticos supracitados. Foi também verificado o tempo entre o nascimento e a inclusão no programa de FC do HC da UFPR através da triagem neonatal, assim como a relação entre a precocidade do diagnóstico com o número de culturas positivas para os principais patógenos.

As frequências das bactérias associadas o cBc, bem como o mesmo de forma isolada, foram somadas ao longo do período de 2008 a 2012 e comparadas por meio do teste de Qui Quadrado para K proporções.

As frequências de pacientes diagnosticados com as bactérias patogênicas (*S.aureus*, *H. influenzae*, *P. aeruginosa*, cBc, MRSA) foram comparadas em cada um dos anos do estudo.

Em todas as análises estatísticas foi utilizado o nível de significância de 0,05, sendo todos os testes realizados no programa estatístico XLStat2013 (Addinsoft,2013).

5 RESULTADOS

Foram coletados dados dos 83 pacientes triados e acompanhados pelo Ambulatório de Fibrose Cística do Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC- UFPR) referentes a idade, gênero, data de nascimento, data de inclusão no programa de Fibrose Cística do HC, número de culturas realizadas positivas e negativas, para *P. aeruginosa*, cBc, *S. aureus*, MRSA, *H. influenzae*, *Aspergillus* spp., entre outros micro-organismos. Estes dados foram comparados ao longo dos anos de monitoramento (2008 – 2012). Dos 83 pacientes, 62 foram acompanhados a partir de 2 anos de idade (grupo 1) e 21 a partir de 1 mês de idade (grupo 2), quanto ao perfil de colonização do trato respiratório inferior.

Verificou-se que no grupo 1, 27 (44%) pacientes eram do gênero feminino e 35 (56%) do gênero masculino, caracterizando equilíbrio da amostragem em relação ao gênero, e no grupo 2 verificou-se que 15 (71%) eram do gênero feminino e 6 (29%) do gênero masculino, caracterizando um predomínio do gênero feminino. As médias de idade variaram aproximadamente entre 4 ± 2 anos com mínimo de 1 e máximo de 7 anos em ambos os gêneros no grupo 1. Verificou-se que no grupo 1 os meninos geralmente foram incluídos no programa mais tardiamente (68 ± 89 dias) que as meninas (57 ± 56 dias); no grupo 2 as meninas foram incluídas mais tardiamente (39 ± 9 dias) que os meninos (37 ± 13 dias) (TABELA 4).

TABELA 4 – CARACTERÍSTICAS DOS GRUPOS DE PACIENTES CONFORME TEMPO DE ACOMPANHAMENTO

	GRUPO 1		GRUPO 2	
N (%)	27 (44)	35 (56)	15 (71)	6 (29)
Gênero	Feminino	Masculino	Feminino	Masculino
Idade (anos) em 2008	4,0	4,1	0,1	0,1
Variação	1-7	1-7		
Tempo de inclusão (dias)	57 ± 56	68 ± 89	39 ± 9	37 ± 13
(min - máx)	0 - 308	19 - 554	24 - 57	26 - 58

N: número de pacientes

FONTE: O autor (2014)

Ao longo do período de avaliação, no grupo 1 alguns pacientes não realizaram o monitoramento periódico, contudo o número de avaliados permaneceu estatisticamente semelhante durante o período ($\chi^2=0,803$; $p=0,938$) (GRÁFICO 2), sendo 61 pacientes avaliados em 2008, 57 em 2009, 55 em 2010 e 53 em 2011 e 2012.

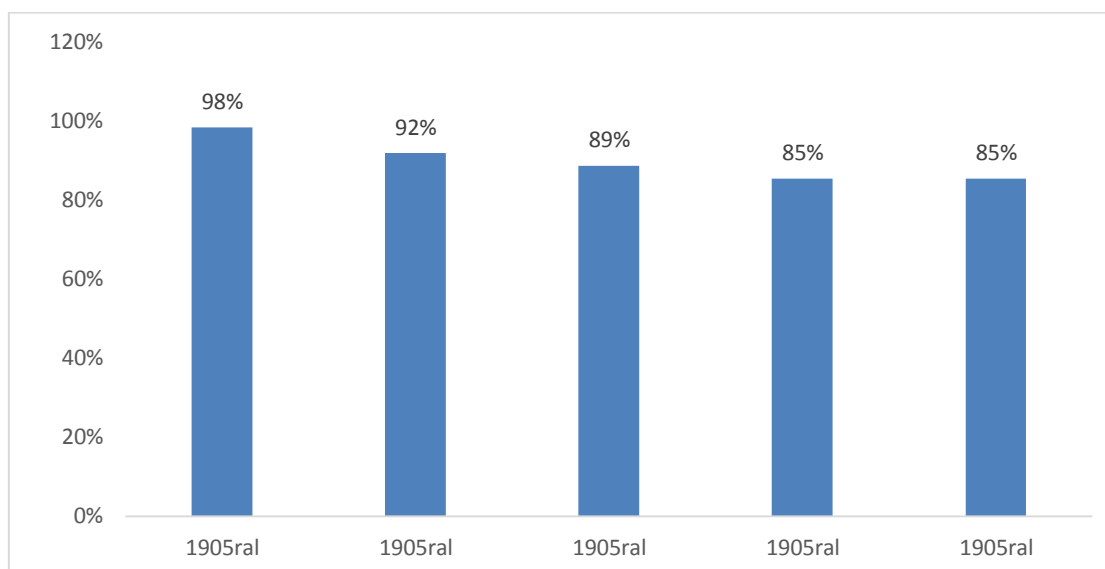


GRÁFICO 2 – Frequência relativa de pacientes avaliados e cadastrados no ambulatório de Fibrose cística HC- UFPR no grupo 1.

Entre os pacientes do grupo 2 (21 pacientes) que foram avaliados desde o nascimento, alguns não realizaram o monitoramento periódico, mas tal número permaneceu estatisticamente semelhante durante o período ($\chi^2=1,405$; $p=0,843$) (GRÁFICO 3), sendo 18 pacientes avaliados em 2008, 2010, 2011 e 2012 e 20 pacientes em 2009.

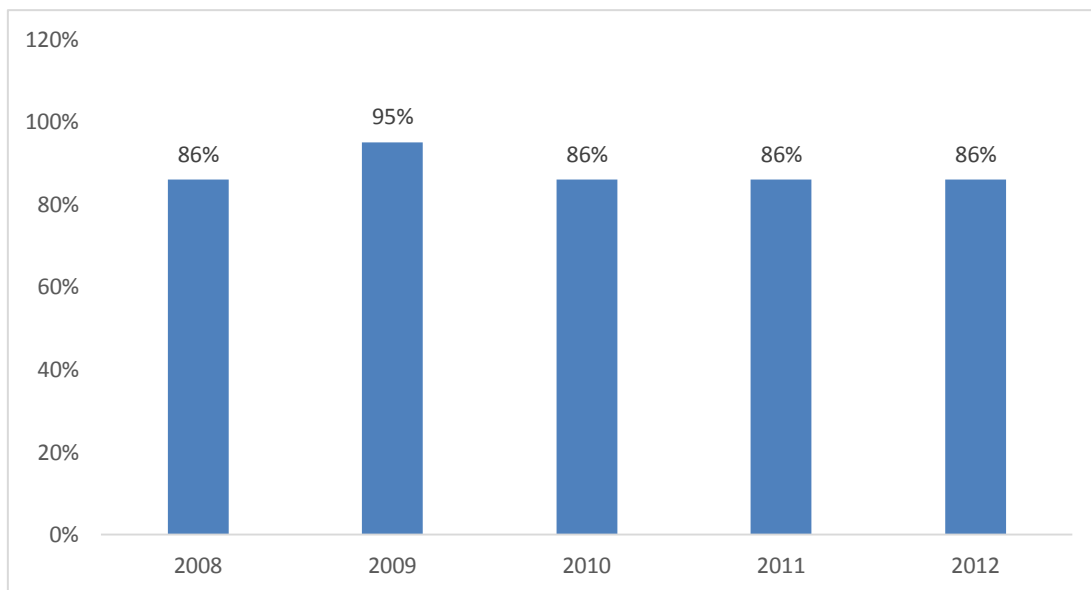


GRÁFICO 3 – Frequência relativa de pacientes avaliados e cadastrados no ambulatório de Fibrose Cística do HC-UFPR no grupo 2.

O média do número de culturas realizadas por paciente no grupo 1 decresceu significativamente a partir de 2008 ($8,89 \pm 4,31$ culturas/paciente) em relação aos demais anos (2009 – $4,65 \pm 2,38$; 2010 – $4,45 \pm 2,72$; 2011 – $4,92 \pm 3,11$; 2012 – $5,87 \pm 3,80$) ($F=4,244=28,895$; $p<0,05$) (TABELA 5). Foi possível observar que ao longo do período, houve um aumento significativo do número de culturas positivas para os patógenos pesquisados ($\chi^2=55,5$; $p<0,0001$), sendo que o acréscimo foi considerado estatisticamente significativo a partir de 2010 e permanecendo com elevadas frequências até 2011, decaindo significativamente em 2012.

TABELA 5 – CULTURAS REALIZADAS E CULTURAS POSITIVAS NO PERÍODO DE 2008 A 2012. MÉDIA \pm DP DE CULTURAS/PACIENTE EM FUNÇÃO DOS ANOS (GRUPO 1)

	Pacientes	Total de culturas	Média \pm DP de culturas/paciente	Culturas Positivas (%)
2008	61	551	8,89 \pm 4,31	286 (52%)
2009	57	288	4,65 \pm 2,38*	161 (56%)
2010	55	276	4,45 \pm 2,72*	202 (73%)
2011	53	305	4,92 \pm 3,11*	220 (72%)
2012	53	364	5,87 \pm 3,80*	223 (61%)

* $p < 0,05$, Teste Tukey: diferença significativa em relação à média no ano de 2008

FONTE: O autor (2014)

O número médio de culturas realizadas por paciente no grupo 2 decresceu significativamente a partir de 2008 (7,90 \pm 6,27 culturas/paciente) e 2009 (6,25 \pm 3,11 culturas/paciente) em relação aos demais anos (2010 – 4,45 \pm 3,50; 2011 – 3,60 \pm 2,23; 2012 – 5,10 \pm 3,39) ($F=4,76=6,006$; $p < 0,05$) (TABELA 6). Foi possível observar que, ao longo do período, houve um aumento significativo do número de culturas positivas para patógenos ($\chi^2=31,83$; $p < 0,0001$), sendo que o acréscimo foi considerado estatisticamente significativo a partir de 2010 e permanecendo com elevadas frequências até 2011, decaindo significativamente em 2012.

TABELA 6 – CULTURAS REALIZADAS E CULTURAS POSITIVAS NO PERÍODO DE 2008 A 2012. MÉDIA \pm DP DE CULTURAS/PACIENTE EM FUNÇÃO DOS ANOS (GRUPO 2)

	Pacientes	Total de culturas	Média \pm DP de culturas/paciente	Culturas Positivas (%)
2008	18	158	7,90 \pm 6,27	58 (37%)
2009	20	128	6,25 \pm 3,11	50 (39%)
2010	18	95	4,45 \pm 3,50*	60 (63%)
2011	18	75	3,60 \pm 2,23*	49 (65%)
2012	18	109	5,10 \pm 3,39*	60 (55%)

* – $p < 0,05$, Teste Tukey: diferença significativa em relação à média no ano de 2008

Ao comparar os patógenos diagnosticados ao longo do período de monitoramento, no grupo 1 foi possível verificar que os patógenos Fungos e leveduras, *P. aeruginosa*, cBc, *S. aureus* e *Haemophilus* sp., apresentaram diferenças estatísticas significativas, tanto no teste de Qui quadrado como no teste de acompanhamento de Marascuilo ($p < 0,05$; TABELA- 6). Todos os gráficos estão no apêndice. As diferenças estão descritas a seguir:

- Fungos e Leveduras: houve um decréscimo significativo da ocorrência de fungos do ano de 2008 para os demais, porém com elevação significativa em 2012 em relação a 2010 e 2011.

-*P. aeruginosa*: houve um acréscimo significativo da ocorrência de culturas positivas com este patógeno a partir de 2010, com novo decréscimo significativo em 2012.

- *S. aureus*: houve um acréscimo significativo de culturas positivas com este patógeno a partir de 2009, permanecendo com frequências elevadas até 2012.

-*Haemophilus sp*: houve um acréscimo significativo de culturas positivas com este patógeno a partir de 2010, permanecendo com as frequências elevadas até 2012.

- Com relação à prevalência de cBc, observou-se que houve uma tendência de aumento de sua frequência, com aumento significativo das frequências em 2011, e redução aos patamares originais dos demais anos em 2012 (GRÁFICO 4).

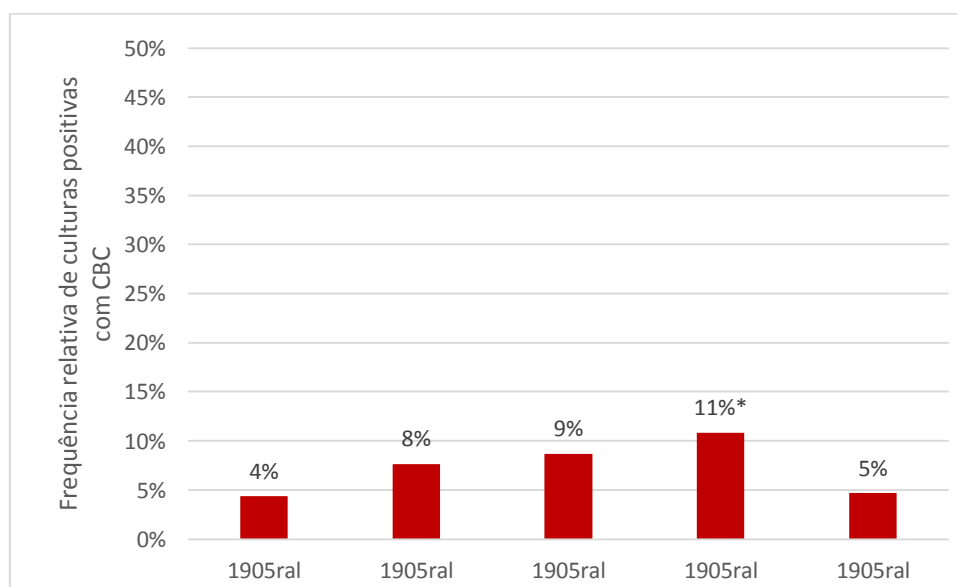


GRÁFICO 4 – Frequência relativa de culturas positivas para cBc entre os pacientes acompanhados no ambulatório de Fibrose Cística do HC-UFPR.(GRUPO 1). * $p < 0,05$ em relação a 2008

Foi observada uma relação inversa entre a ocorrência de fungos e leveduras e de bactérias quando houve o decréscimo de fungos e leveduras em 2010, ocorre elevação de *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Haemophilus sp* e cBc (GRÁFICO 5).

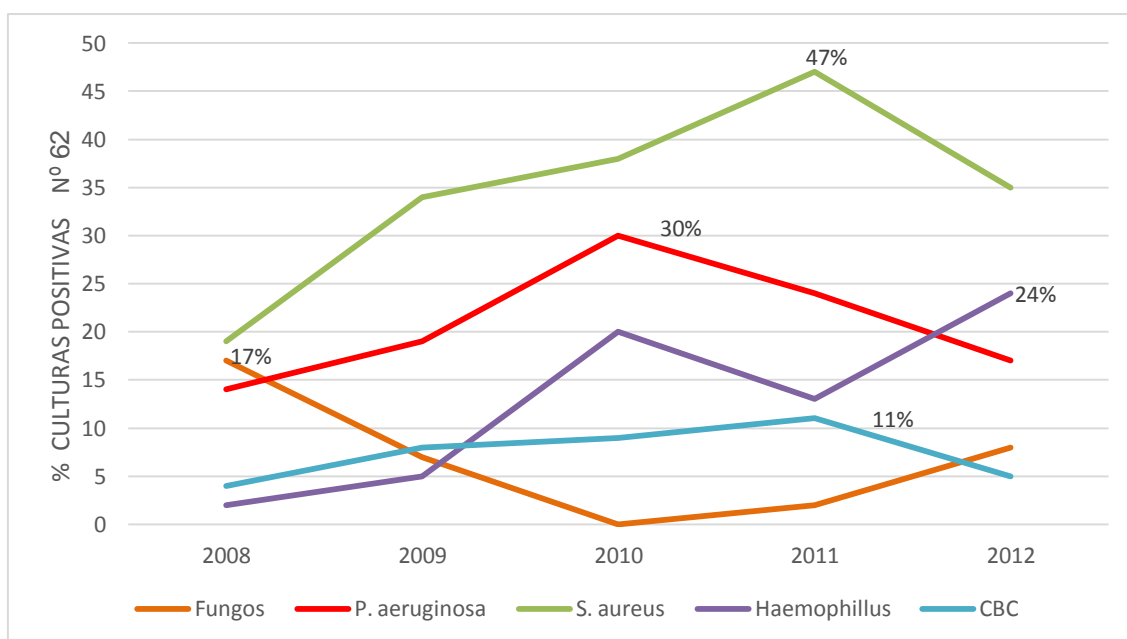


GRÁFICO 5 – Frequência relativa de culturas positivas de fungos e leveduras, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Haemophilus* sp. e cBc em função dos anos de monitoramento entre os pacientes cadastrados no ambulatório de Fibrose Cística do HC-UFPR (grupo 1)

Dos 83 pacientes triados e acompanhados pelo ambulatório de FC do HC, 7 pacientes tiveram cultura positiva para *Aspergillus* spp neste período de observação, dos quais 2 em 2008, 1 em 2010 com repetição em 2011, 1 em 2011, e 3 em 2012, sendo destes apenas 1 do grupo 2.

Na tabela 7 é apresentada a prevalência de culturas positivas e aquelas apenas positivas para fungos e leveduras; e na tabela 8 é apresentada a frequência de bactérias em relação ao número de culturas positivas apenas para as bactérias.

TABELA 7 – PREVALÊNCIAS: FREQUÊNCIAS ABSOLUTAS (n) E RELATIVAS (%) DE OCORRÊNCIA DE CULTURAS REALIZADAS, CULTURAS POSITIVAS E CULTURAS POSITIVAS PARA FUNGOS E LEVEDURAS EM FUNÇÃO DOS ANOS DE MONITORAMENTO. P-VALOR DO TESTE DE QUI QUADRADO (GRUPO 1)

	2008		2009		2010		2011		2012		p
	n	%	n	%	n	%	N	%	n	%	
Culturas realizadas	551		288		276		305		364		
Culturas positivas	286 ^{c,d}	51,9	161 ^{c,d}	55,9	202 ^{a,b,e}	73,2	220 ^{a,b}	72,1	223 ^c	61,3	< 0,0001
Fungos e Leveduras	107 ^{b,c,d,e}	16,7	27 ^{a,c}	6,6	3 ^{a,b,e}	0,4	7 ^{a,e}	2,3	40 ^{a,c,d}	7,7	< 0,0001

– p<0,05, Teste de Marascuilo: diferenças significativas em relação a frequência observada nos anos de: a (2008); b (2009); c (2010); d (2011); e (2012).

TABELA 8 – FREQUÊNCIAS ABSOLUTAS (n) E RELATIVAS (%) DE OCORRÊNCIA DE BACTÉRIAS EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE CULTURAS POSITIVAS PARA BACTÉRIAS PATOGENICAS AO LONGO DOS ANOS DE MONITORAMENTO (GRUPO 1)

	2008		2009		2010		2011		2012		p
	n	%	n	%	n	%	N	%	N	%	
<i>S. aureus</i>	107 ^{b,c,d,e}	37,4	97 ^{a,d}	60,2	106 ^a	52,5	143 ^{a,b,e}	65	127 ^{a,d}	58	< 0,0001
<i>P. aeruginosa</i>	78 ^{c,d}	27,3	54	33,5	82 ^{a,e}	40,6	74 ^a	33,6	61 ^c	27	< 0,0001
cBc	24 ^d	8,4	22	13,7	24	11,9	33 ^a	15	17	8	0,001
<i>Haemophilus</i> sp.	11 ^{c,d,e}	3,8	14 ^{c,d,e}	8,7	55 ^{a,b}	27,2	41 ^{a,b,e}	18,6	89 ^{a,b,d}	40	< 0,0001
MRSA	12	4,2	7	4,3	15	7,4	17	7,7	16	7	0,032
<i>Acinetobacter</i> sp.	9	3,1	2	1,2	1	0,5	0	0	1	0	0,040
*Outras	10	3,5	7	4,3	9	4,5	10	4,5	7	3,1	0,917
Total de Culturas Positivas	286 ^{c,d}	100	161 ^{c,d}	100	202 ^{a,b,e}	100	220 ^{a,b}	100	223 ^c	100	< 0,0001

– p<0,05, Teste de Marascuilo: diferenças significativas em relação a frequência observada nos anos de: a (2008); b (2009); c (2010); d (2011); e (2012).

***Outras** : *Stenotrophomonas maltophilia*; *Myroides odoratus*; *Sphingomonas* sp; *Chryseobacterium* sp.; *Comamonas acidovorans*; *Achromobacter xylosoxidans*

Além das espécies supracitadas, nos anos de 2010 a 2012 foram detectados novos patógenos anteriormente não listados. Em 2010 foi possível verificar uma cultura positiva para *Cornebacterium* sp.; e em 2011 verificou-se 2 culturas positivas para *Enterococcus fecalis* sp.; ainda em 2012, foram verificadas 2 culturas positivas para *Moraxella catharralis* e uma cultura positiva para *Escherichia coli*.

Apesar de que a precocidade de entrada no programa de Fibrose Cística por meio da triagem neonatal diminui o número de culturas positivas para bactérias patogênicas, tal fato não foi comprovado com a presente amostra (GRÁFICO 6). Foi possível verificar que os pacientes que iniciaram o acompanhamento logo no primeiro mês após o nascimento, ou no 2º mês após o nascimento, ou acima de 3 meses após o nascimento não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si. Vale ressaltar que o grupo que começou o acompanhamento no 2º mês após o nascimento apresentou um acréscimo significativo de porcentagem de culturas positivas em 2012, quando comparados ao ano de 2008 ($p=0,0006$). Os demais grupos não apresentaram acréscimos significativos ($p>0,05$), grupo 1.

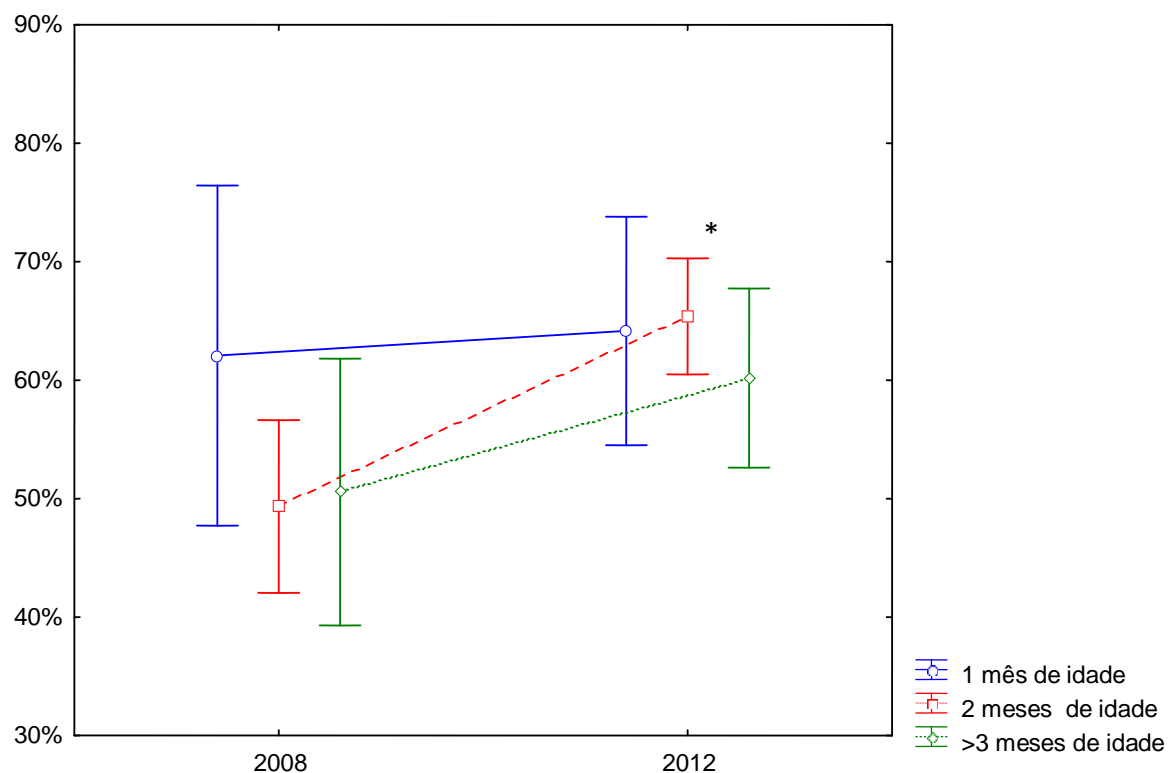


GRÁFICO 6 –Médias e intervalos de confiança da porcentagem de culturas positivas para bactérias patogênicas em relação ao tempo de inclusão no programa de Fibrose Cística do HC-UFPR no grupo 1.
*p=0,0006

No grupo 2 as crianças que iniciaram o acompanhamento logo no primeiro mês após o nascimento, e as que iniciaram o acompanhamento após 2 meses do nascimento, verificou-se o mesmo perfil médio de culturas positivas ao longo do tempo ($F=0,11901$; $p=0,97535$) (GRÁFICO 7) .

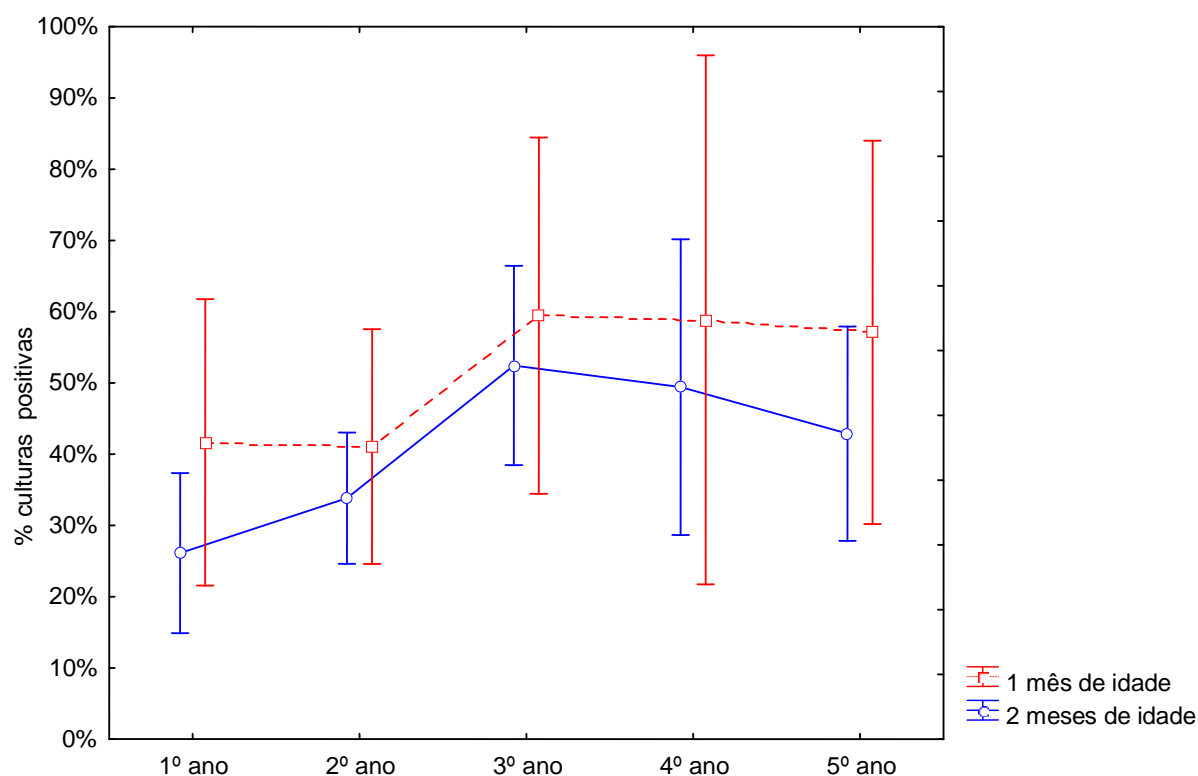


GRÁFICO 7 – Médias e intervalos de confiança da porcentagem de culturas positivas para bactérias patogênicas em relação ao tempo de inclusão no programa de Fibrose Cística do HC-UFPR, no grupo 2.

Ao avaliar os 21 pacientes (grupo 2) que nasceram no ano de 2008/2009 e que foram acompanhados desde o 1º mês de idade pelo programa, foi possível verificar que entre o 3º e o 4º ano de acompanhamento ocorreu um aumento significativo da frequência de ocorrência de culturas positivas. No 5º ano de acompanhamento houve uma redução do número de culturas positivas entre os analisados, porém ainda considerado estatisticamente semelhante aos anos anteriores (GRÁFICO 8).

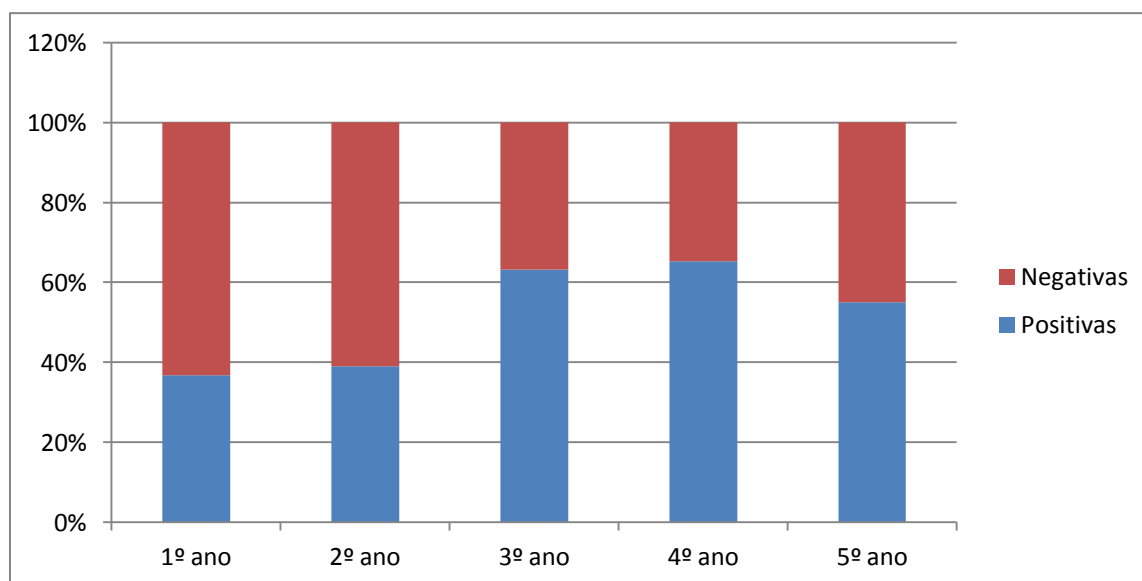


GRÁFICO 8 – Frequência relativa acumulada de culturas positivas e negativas dos pacientes UFPR nascidos em 2008/2009 (grupo 2).

Em relação à comparação dos patógenos diagnosticados entre as classes etárias, foi possível verificar que fungos e leveduras, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, MRSA e *Haemophilus* sp. apresentaram diferenças estatísticas significativas, ($p < 0,05$; TABELA. 9) tanto no teste de Qui quadrado como no teste de acompanhamento de Marascuilo. Todos os gráficos estão no apêndice. As diferenças estão descritas a seguir:

- Fungos e leveduras: houve decréscimo significativo de frequência de culturas positivas até o 4º ano de acompanhamento, com crescimento significativo de tal frequência no 5º ano.
- *P. aeruginosa*: houve acréscimo significativo das frequências de culturas positivas com este patógeno a partir do 3º ano de acompanhamento, decrescendo significativamente no 5º ano.
- *S. aureus*: houve acréscimo significativo das frequências de culturas positivas com este patógeno, apresentando pico de frequência no 4º ano de acompanhamento, seguido de decréscimo para a frequência observada no 1º ano de acompanhamento.
- MRSA: apesar de ser observada a tendência ao aumento de frequência deste patógeno, a diferença entre os anos de acompanhamento não foi considerada significativa.

- *Haemophilus sp.*: houve acréscimo significativo das frequências de culturas positivas com este patógeno a partir do 3º ano de acompanhamento, permanecendo com as frequências elevadas até o último ano de acompanhamento.

A seguir, estão representadas em conjunto as frequências de culturas positivas no grupo 2 (GRÁFICO 9), quando foi possível verificar o acréscimo das frequências ao longo do período de acompanhamento.

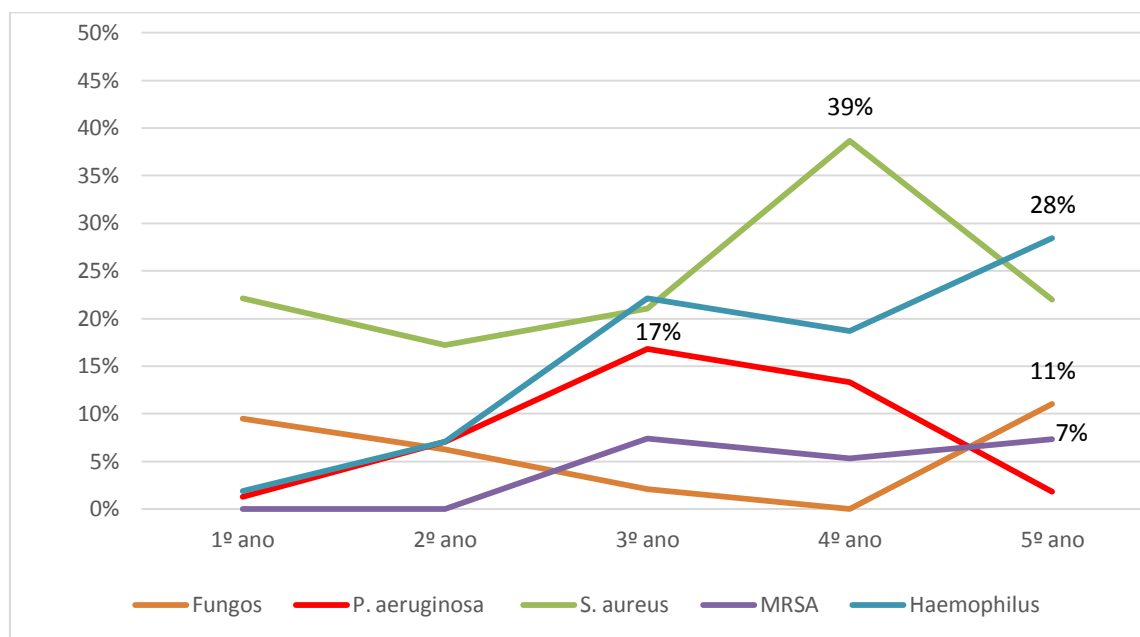


GRÁFICO 9 – Percentual de culturas positivas dos pacientes acompanhados desde o 1º mês de idade nascidos em 2008/2009.

Em média, o aparecimento da primeira cultura positiva dos patógenos no grupo 2 ocorreu da seguinte maneira:

- *S. aureus*: na idade de $1,5 \pm 0,9$ anos, em 19/21 crianças;
- cBc: na idade de $2,0 \pm 1,4$ anos, em 2/21 crianças;
- *Haemophilus sp.*: na idade de $2,3 \pm 0,7$ anos, em 16/21 crianças;
- *P. aeruginosa*: na idade de $2,6 \pm 1,0$ anos, em 11/21 crianças;
- MRSA: na idade de 3,0 anos, em 2/21 crianças.

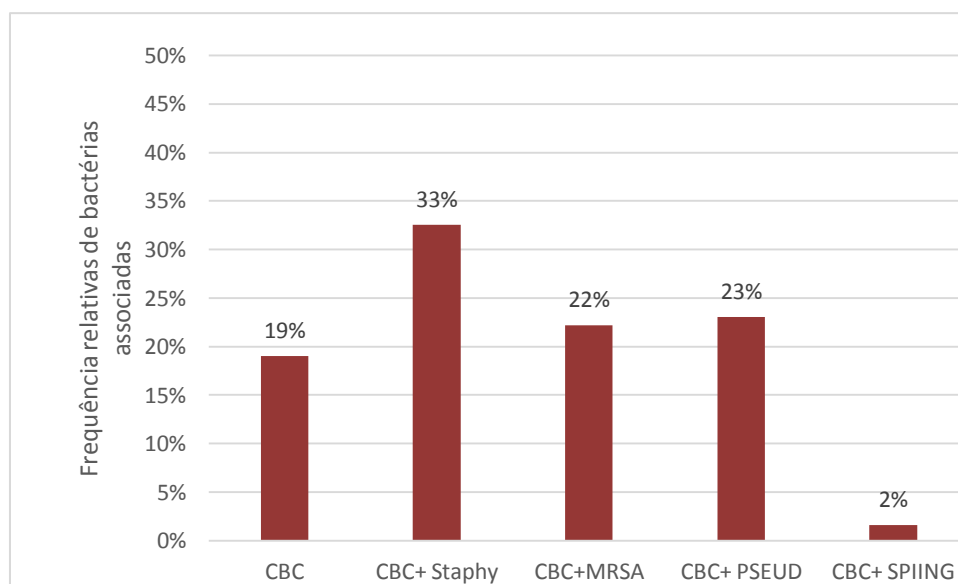
TABELA 9 – FREQUÊNCIAS ABSOLUTAS (n) E RELATIVAS (%) DE OCORRÊNCIA DE CULTURAS NEGATIVAS E POSITIVAS (ESPECÍFICADAS POR PATÓGENOS) EM FUNÇÃO DOS ANOS DE ACOMPANHAMENTO. P-VALOR DO TESTE DE QUI QUADRADO, (GRUPO 2).

	1º ano		2º ano		3º ano		4º ano		5º ano		p
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
CULTURAS	158	100	128	100	95	100	75	100	109	100	-
Negativas	100 ^{c,d}	63	78 ^{c,d}	61	35 ^{a,b}	37	26 ^{a,b}	35	49	45	< 0,0001
Fungos e leveduras	15 ^d	9	8	6	2	2	0 ^a	0	12 ^d	11	0,007
<i>S. aureus</i>	35	22	22 ^d	17	20	21	29 ^b	39	24	22	0,011
<i>P. aeruginosa</i>	2 ^c	1	9	7	16 ^{a,e}	17	10	13	2 ^c	2	< 0,0001
CBC	3	2	0	0	2	2	1	1	0	0	0,327
<i>Haemophilus</i> sp.	3 ^{c,e}	2	9 ^{c,e}	7	21 ^{a,b}	21	14 ^a	19	31 ^{a,b}	28	< 0,0001
MRSA	0	0	0	0	7	7	4	5	8	7	0,000
<i>Acinetobacter</i> sp.	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0,848
*Outras	3	2	9	7	5	5	6	8	1	1	0,034

- p<0,05, Teste de Marascuilo: diferenças significativas em relação a frequência observada no: a(1º ano); b (2º ano); c (3º ano); d (4º ano); e (5º ano)

***Outras:** *Stenotrophomonas* sp; *Myroides odoratos*; *Chryseobacterium* sp; *Achromobacter xylosoxidans*

Em 25/83 (30,1%) pacientes a cBc foi identificada nas culturas. No gráfico 10 são apresentadas as frequências relativas de culturas positivas para cBc isolada ou associada a outras bactérias, cBc isolada apresentou frequências equivalentes às associações cBc + *S. aureus*, cBc + MRSA e cBc + *P. aeruginosa* (p>0,05).



cBc +Sping= complexo *Burkholderia cepacia* associado a *Sphingomonas* sp.

GRÁFICO 10 – Frequências relativas de culturas positivas para cBc isolada e associada à outras bactérias, dos 83 pacientes.

6 DISCUSSÃO

A fibrose cística é uma doença genética caracterizada por infecções crônicas das vias aéreas com exacerbações pulmonares intermitentes. A microbiota responsável pelas infecções das vias aéreas por muitas décadas tem sido determinada por métodos de cultura de bactérias e fungos, enfocando os micro-organismos mais comumente isolados, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Haemophilus influenzae*. No entanto, muitos outros micro-organismos normalmente não recuperados do trato respiratório de indivíduos saudáveis têm sido associados com a evolução da doença das vias aéreas nos indivíduos FC ao longo da última década, incluindo bacilos gram-negativos não fermentadores como o complexo *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter* spp e fungos como o *Aspergillus* sp.(BURNS e ROLAIN, 2014).

Neste estudo foi possível observar as principais colonizações microbianas de pacientes triados ao nascer e que foram acompanhados em um período de 5 anos. Este grupo de pacientes foi dividida em 2 grupos, sendo um grupo com 62 crianças com mediana de idade de 4 anos e outro com 21 crianças que foram acompanhadas a partir de um mês de idade. O tempo de inclusão no programa de fibrose cística do HC- UFPR para os dois grupos foi em média 2 meses, concordando com os dados encontrados pelo *Cystic Fibrosis Foundation* (2008). Aquela instituição relatou que, de um total de 5771 pacientes, 2103 (36,4%) foram diagnosticados entre 0-3 meses de idade, enquanto o Registro Brasileiro de Fibrose Cística (RBFC) (2010) relatou média de idade ao diagnóstico de 5,9 anos, com apenas 10,1% dos pacientes diagnosticados através da triagem neonatal.

Todos os pacientes do estudo foram diagnosticados pela triagem neonatal e, assim que confirmado o diagnóstico de FC, foram monitorados pelo ambulatório de FC por uma equipe multidisciplinar. Este é um dos benefícios da triagem pois a possibilidade de acompanhar de perto a evolução destes pacientes e ao primeiro sinal de alteração foi possível realizar a intervenção adequada evitando ou diminuindo as complicações, resultando em melhor qualidade de vida e maior sobrevida.

SOUTHERN *et al.* (2009), em revisão sistemática sobre triagem neonatal em fibrose cística cujo objetivo era examinar os benefícios da triagem neonatal para FC *versus* pacientes com diagnóstico tardio, através da análise de um ensaio clínico randomizado, chegaram a conclusão que pacientes triados apresentaram melhores taxas de crescimento, diminuição da taxa de desnutrição com melhores taxas de ganho ponderal, e em relação aos benefícios da triagem na função pulmonar foram mais evidentes na primeira infância, destacaram ainda que os custos para triagem são menores do que para a realização de diagnóstico tardio.

Diversos estudos também relatam os benefícios da triagem neonatal, principalmente em relação à melhora do prognóstico com maior sobrevivência decorrente ao diagnóstico precoce somado ao benefício do tratamento especializado em centro de referência (SANTOS *et al.*, 2005; RATJEN e DORING, 2003; CAMARGOS *et al.*, 2000; SIMS *et al.*, 2005; STRAUSBAUGH *et al.*, 2007; ALVAREZ *et al.*, 2004).

Segundo as diretrizes da *Cystic Fibrosis Foundation*, cada paciente deve realizar quatro visitas por ano, ou mais em casos de exacerbação pulmonar, em centro especializado de atendimento de FC para o melhor acompanhamento da evolução do quadro clínico e das colonizações microbianas pulmonares, direcionando um melhor prognóstico e tratamento. Desde 1993 HUDSON *et al.*, quando avaliaram a evolução da microbiota da orofaringe em pacientes com FC diagnosticados antes de dois anos de idade já recomendavam que para um melhor controle das colonizações esta população deveria ser vista de 3 a 4 vezes por ano. Em trabalho envolvendo 3 centros americanos de atendimento a pacientes FC, realizado com 40 crianças nos 3 primeiros anos de vida, cujo objetivo era investigar as alterações fenotípicas das colonizações com *P. aeruginosa* com culturas orofaríngeas e lavado broncoalveolar, foi possível prever as colonizações das vias aéreas inferiores com culturas de orofaringe realizadas a cada 3 meses, ou seja, 4 visitas por ano em substituição ao procedimento invasivo para obtenção de muco em crianças (BURNS *et al.*, 2001). Já no trabalho realizado por MAGALHÃES *et al.*, (2004) com fibrocísticos do Recife, o número de culturas realizadas por paciente variou amplamente de uma a 12 com mediana de 4, pois os pacientes foram orientados a comparecer

ao ambulatório a cada três meses ou quando houvesse exacerbação da infecção respiratória.

No presente estudo a média de culturas realizadas por paciente por ano foi em torno de 4, concordando com os achados da literatura. Foi observado que a partir do ano de 2010 ocorreu um aumento significativo do número de culturas positivas ($p < 0,0001$), com posterior queda significativa em 2012 em ambos os grupos, ou seja, entre o 3º e 4º ano de acompanhamento ocorreu um aumento do número de culturas positivas. Foi possível uma análise mais aprimorada deste evento no grupo acompanhado desde o nascimento quando, no primeiro ano de acompanhamento, em média, havia 37% de culturas positivas contra 63% negativas. Já no 3º ano havia em média 63% de culturas positivas contra 37% de negativas; estes valores se mantiveram no 4º ano com posterior queda no 5º ano de acompanhamento, levando à conclusão de que, mesmo sendo acompanhados desde o nascimento estes pacientes foram colonizados pelos principais micro-organismos, embora através de intervenção e tratamento precoces tenha sido possível reverter a frequência de colonizações e infecções.

A população de pacientes do estudo compreendeu desde lactentes a crianças até 10 anos, e corroborando a literatura foi observado um predomínio de *S. aureus* em 47% das culturas do grupo 1 e 39% no grupo 2 no ano de 2011, concordando com um estudo envolvendo 25 crianças triadas ao nascer na faixa etária de 1 mês a 3 anos realizado no HC-UFPR no período de 25 de agosto de 2003 a 6 de dezembro de 2004 onde foi detectado 39,7% das amostras positivas para *S. aureus* (SOUZA *et al.*, 2006). O presente trabalho, porém discorda quanto à variável tempo para o primeiro isolamento de *S. aureus*, pois foi encontrada média de 18 meses em 19/21 pacientes acompanhados, discordando dos achados do grupo de Souza que observou média 7 meses para o primeiro isolamento por *S. aureus* (SOUZA *et al.*, 2006). Culturas positivas para *H. influenzae* apresentaram maior frequência em ambos os grupos a partir de 2010, com manutenção de níveis elevados até 2012 variando respectivamente de 20% para 24% no grupo 1, e de 22% para 28% no grupo 2, o aumento observado pelos grupos pode ser explicado devido a este patógeno geralmente estar envolvido em infecções pulmonares crônicas e exacerbações agudas principalmente em crianças na primeira infância (ROMAN *et al.*, 2004).

Observando-se apenas as culturas positivas para patógenos, excluindo-se as culturas negativas (onde não houve crescimento de nenhum patógeno) e as positivas para fungos, *S. aureus* foi identificado em 65% das culturas em 2011, corroborando os dados do *Cystic Fibrosis Foundation* (2010) realizado com 26.272 pacientes na faixa etária de 2 a 22 anos que encontrou taxa de 67%. Já para outros patógenos como *P. aeruginosa* a taxa foi de 51,2%, bem superior ao encontrado no presente estudo que foi de 40,6% em 2010, e *H. influenzae* foi observado em 17,2% das culturas, frequência relativamente menor em relação aos 40% observados do presente estudo em 2012, no grupo 1.

P. aeruginosa está presente no trato respiratório em mais de 80% dos pacientes com FC. Colonização/infecção por este patógeno está relacionada com maiores índices de morbidade e mortalidade em pacientes com FC. Há evidências de uma progressiva deterioração da função pulmonar e diminuição de sobrevida principalmente com estas colonizações durante os primeiros 5 anos de vida, com um risco 2,6 vezes maior de morte do que os pacientes não colonizados nesta faixa etária (OLIVER *et al.*, 2009). O estudo de HUDSON *et al.* (1993), também demonstrou que crianças colonizadas com *P. aeruginosa* antes dos 2 anos de idade apresentaram significativo aumento ($p < 0,0001$) de mortalidade com redução de 10 anos na sobrevida após o diagnóstico. No Brasil SANTANA *et al.* (2003), realizaram um estudo descritivo observacional de 69 pacientes de 1991 a 2001, observaram uma frequência de 83% de colonização por *P. aeruginosa* em crianças menores de 2 anos, decorrentes das várias hospitalizações em UTI e uso de antibióticos. Discordando do grupo de Santana, na amostra de pacientes acompanhados desde o 1º mês de idade, do presente estudo, 11 de 21 crianças apresentaram cultura positiva para *P. aeruginosa*, com uma frequência de 17% no 3º ano de acompanhamento, sendo a primeira cultura positiva em média aos 2,6 anos, corroborando os estudos dos grupos de West e Douglas para a variável tempo da primeira colonização. O primeiro realizou uma análise longitudinal do comportamento das colonizações por *P. aeruginosa* em um grupo de 68 pacientes triados ao nascer do *Wisconsin CF Neonatal Screening Project*, onde observou que a primeira colonização por *P. aeruginosa* foi aos 2,5 anos (WEST *et al.*, 2002). O segundo avaliou a colonização e erradicação de *P. aeruginosa* em 33 crianças triadas ao nascer, chegando à conclusão que a primeira colonização por *P. aeruginosa* ocorreu aos

2,5 anos em 28% dos pacientes avaliados antes dos 6 anos de idade (DOUGLAS *et al.*, 2009).

As evidências sugerem que *S. aureus* predispõe à colonização por *P. aeruginosa*. Segundo LYCZAK *et al.* (2002), a predisposição à colonização por *P. aeruginosa* poderia estar relacionada à terapia anti-estafilocócica. Em várias partes do mundo levantou-se a questão sobre o tratamento profilático que pode aumentar a suscetibilidade a infecções por outros agentes como *H. influenzae* e *P. aeruginosa*. Estudo com 3.219 pacientes FC do *European Registry of Cystic Fibrosis* mostrou que a terapia anti-estafilocócica contínua profilática aumentou o número de culturas positivas para *P. aeruginosa*, principalmente na faixa etária de 0-6 anos. Esta progressão da infecção de *S. aureus* para *P. aeruginosa*, porém foi questionada no estudo de BURNS *et al.*, (2001), onde os autores encontraram evidências de infecção por *P. aeruginosa* em 97,8% das crianças com até 3 anos de idade (LYCZAK *et al.*, 2002). Segundo o *Cystic Fibrosis Trust* (2009), no entanto a colonização por *P.aeruginosa* ocorre normalmente com a evolução da doença, podendo ser intermitente no início mais posteriormente tornando-se crônica (presença de *P.aeruginosa* na árvore brônquica, por 6 meses, no mínimo, com presença de sinais e sintomas).

De acordo com o relatório anual do CFF (2001), a prevalência de *S. aureus* em secreções respiratórias é de cerca de 40% durante os primeiros anos de vida, aumentando para 58% durante a adolescência. Estes dados são distintos no presente estudo que observou 47% de colonização no grupo 1 e 39% no grupo 2 no 4º ano de acompanhamento. Douglas *et al.* (2009) descrevem *P.aeruginosa* em 28% dos pacientes FC até 6 anos de idade, corroborando o presente estudo que observou 30% de colonização com *P. aeruginosa* no 3º ano de acompanhamento dos pacientes do grupo 1.

Ainda de acordo com o CFF (2001), o cBc pode estar presente em cerca de 3% dos pacientes FC em todas as idades podendo chegar a 8% na idade adulta. Na relatório da CFF de 2012 observou-se 2,6% de colonizações pelo cBc em uma amostra de 27.804 pacientes de 2 a 19 anos de idade. Já o estudo de ALVAREZ *et al.* (2004) encontrou uma prevalência de colonização por cBc de 5,2% em 104 pacientes com idades variando de 1 mês a 20 anos acompanhados durante 10 anos na UNICAMP- SP, e referiu ser este um achado preocupante, pois este é um patógeno associado a um pior prognóstico com

diminuição de sobrevida (MAHENTHIRALINGAM, 2010). Concordando com o estudo do grupo de ALVAREZ nesta casuística, foi observado no primeiro ano de acompanhamento uma frequência de 4% no grupo 1 com aumento significativo ($p < 0,05$) para 11% no 4º ano de acompanhamento e subsequente retorno aos níveis iniciais, evidenciando provavelmente eficácia no combate à cronificação de um agente altamente patogênico por meio de medidas de controle de infecção. No grupo de pacientes acompanhados desde o nascimento 2 das 21 crianças, (10%) foram colonizadas por cBc até os 2 anos de idade.

No Brasil, o RBFC de 2010 revelou frequência de cBc em crianças até 5 anos de 11,6% e de 5 à 10 anos de 9,21%, discordando dos achados do presente estudo que evidenciou 2% e 11% respectivamente de acordo com as mesmas faixas etárias. Em relação à prevalência de pacientes colonizados por cBc, porém observou-se alta frequência, sendo que 25 dos 83 pacientes, ou seja, 30,1% da amostra, apresentaram cultura positiva para cBc. No estudo realizado em Recife por MAGALHÃES *et al.* (2004), dos 36 pacientes avaliados 14 (38,9%) estavam colonizados por cBc, enquanto DENTINI (2010) na Unicamp-SP relatou que, dos 222 pacientes avaliados 50 (22,5%) estavam colonizados por cBc, de acordo com o mesmo autor, as maiores taxas de frequência e prevalência podem advir de melhores técnicas de isolamento através da utilização de meios seletivos apropriados (BCSA), da ocorrência de infecções cruzadas, ou ser esta uma característica regional. Para a análise das culturas da presente amostra foi utilizado meio seletivo (BCSA) segundo protocolo da unidade.

Outro ponto relevante que pode intensificar o quadro de lesão pulmonar em pacientes colonizados por cBc é a presença de co-colonização/infecção com outros patógenos simultaneamente ao cBc. As maiores frequências de associação encontradas neste estudo foram com *S. aureus* (33%), seguido de *P. aeruginosa* (23%) e MRSA (22%), contudo foi possível verificar que cBc isolado apresenta frequências equivalentes às associadas com outros patógenos. O estudo de WHITEFORD *et al.* (1995), observou que crianças com quadro de co-colonização, principalmente cBc associado a *P. aeruginosa* apresentou um aumento significativo do declínio da função pulmonar e da mortalidade em comparação com casos onde se isolou apenas *P. aeruginosa*. Estes dados

corroboram o estudo de CORREIA *et al.*, (2008), que avaliaram 31 pacientes de 1995 e 2006 quanto ao perfil de colonização por membros do cBc. Os autores observaram que cerca de 94% dos pacientes estavam co-colonizados/infectados com bactérias de outros gêneros, e destes 6 (38%) faleceram durante o período do estudo. Neste mesmo estudo foi observado um caso de 2 irmãs conviventes que não apresentavam infecção pela mesma estirpe, e só após 4 anos de convivência houve infecção simultânea pela mesma estirpe (CORREIA *et al.*, 2008). No presente estudo dois irmãos apresentaram o mesmo perfil de colonização durante os 5 anos de acompanhamento com o mesmo número de isolados por ano, embora não se saiba se era mesma estirpe, pois não foi realizado a identificação das espécies.

De acordo com SPEERT *et al.* (2002), a transmissão do cBc pode se dar por contato direto paciente-paciente ou contato indireto, através do próprio ambiente. O risco de infecção por bactérias do cBc é elevado e geralmente associado a maior risco de morbidade e mortalidade. No entanto existe grande heterogeneidade no desfecho entre pacientes FC infectados com o cBc, alguns têm um declínio fulminante da função pulmonar com elevado risco de óbito outros, porém, podem abrigar cepas do cBc por períodos de tempo prolongado sem efeitos adversos óbvios. A diferença no prognóstico entre os pacientes infectados pelas mesmas estirpes não foi devidamente explicada, mas pode resultar, em parte, do grau de patogenicidade da cepa infectante, da resposta do paciente ao agente agressor, e das co-colonizações com outros patógenos (CORREIA *et al.*, 2008). É consenso no entanto que políticas de prevenção da colonização por cBc devem ser mantidas (PRETTO *et al.*, 2013), pois as infecções, segundo LIOU *et al.* (2001), estão quase sempre associadas a processo de aceleração da doença pulmonar e diminuição da sobrevida dos pacientes FC.

A frequência de isolados clínicos de *S. aureus* oxacilina-resistentes (MRSA) tem aumentado significativamente entre os pacientes com FC. No Brasil a incidência é alta, em torno de 30 a 50% dependendo da região (MARTINS *et al.*, 2014). Esses isolados geralmente são adquiridos em hospitalizações e tratados com maiores doses de antibióticos intravenosos (MIAL *et al.*, 2001; CAMPANA *et al.*, 2004; MUHLEBACH *et al.*, 2011). Diversos autores relatam maior deterioração da função pulmonar nos pacientes

colonizados por MRSA, (REITER *et al.*, 2010; KAHL, 2010; VANDERHELST *et al.*, 2012). O grupo de Mial (2001) relata não haver significativo comprometimento da função respiratória, mas sim um efeito adverso no crescimento, pois observou que crianças colonizadas por MRSA apresentavam ganho de estatura significativamente menor que os controles (pacientes não colonizados) (MIAL *et al.*, 2001).

Neste estudo a frequência de colonização por MRSA foi menor ($p=0,032$) que o descrito na maior parte da literatura sobre o assunto. No grupo 1 em 2011 a frequência de MRSA foi de 7,7% e no grupo 2 em 2010 atingiu 7% em 2 das 21 crianças colonizadas sendo o aparecimento da primeira colonização por volta dos 3 anos de idade. Em um estudo com características semelhantes aos do grupo 2, Souza *et al.* (2006) observou uma frequência de 24,6% de MRSA no total das positivas para *S. aureus* referente à colonização em 3 pacientes, que, de acordo com os autores provavelmente foi decorrente das várias hospitalizações, dado consideravelmente superior ao do presente estudo que refere a colonização em 2 pacientes. Também em discordância com os resultados do presente estudo, BURNS *et al.*, (1998), encontraram uma frequência de 18,8% de MRSA em uma população de 595 pacientes de 69 centros especializados no atendimento de FC nos Estados Unidos, e atribuíram este achado à utilização de melhores técnicas de isolamento após o consenso elaborado na conferência de microbiologia para FC em 1994 (BURNS *et al.*, 1998 *apud* CFF, 1994). O RBFC (2010), porém, em amostra de 1440 pacientes encontrou em 9,3% colonização por MRSA, o que poderia ser resultado de diferentes centros de tratamento com diferentes técnicas sem padronização. Segundo MARQUES, (2011), os diferentes valores obtidos possivelmente decorrem de diferenças regionais nas técnicas de controle.

Poucos trabalhos citam o isolamento de *Acinetobacter baumannii* em pacientes FC na presente amostra foi observada uma frequência de 3,1% em 2008, referente a 9 colonizações no grupo 1. Outras bactérias menos prevalentes como *S. maltophilia*, *Myroides odoratus*, *Achromobacter xylosoxidans* também foram isoladas em baixas frequências. Quando somadas no decorrer dos 5 anos de acompanhamento foi encontrado no máximo 10 colonizações (4,5%) em 2011 nos pacientes com menos de 10 anos de idade, e 9 colonizações (8%) em 2011 nos pacientes menores de 5 anos de idade. As

baixas frequências observadas podem ser decorrentes da característica da população estudada pois, segundo FOWERAKER (2009), estes bacilos gram-negativos geralmente surgem após uso prolongado e repetido de antimicrobianos anti-pseudomonas e geralmente acomete adultos jovens.

Stenotrophomonas maltophilia é um patógeno capaz de causar diversos tipos de infecções em pacientes debilitados com uso prévio de antimicrobianos, como por exemplo os fibrocísticos (TORO et al., 2006). Nesta casuística todos os 7 pacientes estavam colonizados por *P. aeruginosa* e apenas 3 dos 7 pacientes estavam colonizados por *S. maltophilia*.

Como parte da rotina de monitoração dos pacientes FC acompanhados pelo ambulatório de FC do HC-UFPR é também realizada a pesquisa para fungos em busca principalmente da presença de *Aspergillus* spp. considerado fator de risco para o desenvolvimento de aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA), cujas principais manifestações são infiltrados pulmonares, bronquiectasias, fibrose pulmonar, sibilância, e deterioração da função pulmonar. A prevalência é maior em adolescentes e adultos jovens variando de 0,5 a 11% sendo considerada clinicamente de difícil diagnóstico (OLIVER et al., 2009; MILLER e GILLIGAN, 2003; CARNEIRO et al., 2008; LIPUMA, 2010). No presente trabalho 7 dos 83 pacientes, destes apenas 1 do grupo 2 apresentou cultura positiva para *Aspergillus* spp. representando 8,4% da amostra, corroborando a literatura sobre o assunto. Por se tratar de um estudo observacional que buscou resultados laboratoriais microbiológicos não foi possível fazer um relação entre a presença de positividade da cultura com a apresentação clínica dos pacientes estudados em relação ao risco para o desenvolvimento de ABPA.

Uma observação muito interessante foi a relação inversa entre frequência de culturas positivas para fungos em relação à frequência dos patógenos mais prevalentes: *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *H. influenzae* e cBc. Esta observação está ilustrada na figura 7, ressaltando que quando ocorreu um decréscimo de fungos em 2010 ocorreu simultaneamente um pico de *P. aeruginosa* no grupo 1, sendo também observado o mesmo comportamento para o grupo 2. De acordo com alguns autores este fato pode ser decorrente da inibição do crescimento de fungos quando da presença de *P. aeruginosa* no trato pulmonar (OLIVER et al., 2009; LYCZAK et al., 2002; CHOTIRMALL et al., 2008). O grupo de

CHOTIRMALL em estudo realizado entre 2001 e 2005 avaliando 50 pacientes FC Irlandeses observou culturas positivas para *Aspergillus* spp. em 15 pacientes (30%) dos quais 6 pacientes (12%) desenvolveram ABPA. Estes autores observaram também que a presença de *P.aeruginosa* inibe o crescimento de *Aspergillus* spp., explicando assim o porquê da alta porcentagem de culturas negativas para *Aspergillus* spp. (CHOTIRMALL et al., 2008).

Por outro lado alguns autores afirmam o contrário, que a maior duração de colonização por *P. aeruginosa* é um grande fator de risco para o desenvolvimento de ABPA. Segundo o *Cystic Fibrosis Consensus Conference*, (2003) ABPA está totalmente associada à colonização por *P. aeruginosa* e *S. aureus*. RITZ et al., (2005) comparou um grupo de pacientes para ABPA e outro com sensibilização para *Aspergillus fumigatus* e notou maior associação de ABPA nos pacientes colonizados por *P. aeruginosa* e *S. maltophilia*. Para JUBIN et al. (2010) o uso prolongado de antibioticoterapia oral e inalatória para o tratamento de infecções crônicas por *P. aeruginosa* e *S. maltophilia* foi associado com maior risco de ABPA.

De acordo com Rosário e Riedi (2013), deve-se dar atenção especial à presença de *Aspergillus fumigatus* nos exames de rotina. A sensibilização do *Aspergillus* spp. detectada por testes cutâneos com antígenos específicos, ou pela determinação de anticorpos IgE no sangue, é essencial para o diagnóstico de ABPA, porém é importante diferenciar entre colonização pelo fungo, sensibilização alérgica e a doença ABPA, que ocorre em torno de 1% a 11% dos casos. Cultura positiva para *Aspergillus* spp. tem papel auxiliar mas não é diagnóstico para ABPA (BRITO et al., 2014), pois a presença de *Aspergillus* spp. em uma cultura não indica necessariamente o diagnóstico de ABPA. Em pacientes que não estão melhorando com os tratamentos tradicionais, porém, deve ser considerada a possibilidade de diagnóstico de ABPA (CHOTIRMALL et al., 2008).

Os dados observados no estudo corroboram a literatura que atribui à estratégia a triagem neonatal possibilidade de diagnóstico e tratamento precoces, pois foi possível observar que embora tenham sido colonizados pelos principais patógenos, ao final do 5º ano de acompanhamento apresentaram diminuição das colonizações, isto possivelmente decorrente do tratamento.

7 CONCLUSÕES

- 1- A colonização por *Pseudomonas aeruginosa* está de acordo com as evidências; *Haemophilus influenzae* apresentou manutenção de níveis elevados a partir do 3º ano de acompanhamento, de acordo com a literatura; já a colonização por MRSA foi menor que a encontrada na literatura; Observou-se uma relação inversa entre a frequência de culturas positivas para fungos com a frequência dos principais patógenos, sugerindo efeito inibidor da *P. aeruginosa* em relação a colonização por fungos.
- 2- O complexo *Burkholderia cepacia* apresentou níveis em elevação com pico no 4º ano de acompanhamento e subsequente retorno aos níveis iniciais no 5º ano, a taxa de isolamento do cBc apresentou frequências equivalentes às associadas com os principais patógenos, sendo a maior frequência associada a *S. aureus*. A prevalência nas crianças acompanhadas desde o 1º mês de idade foi baixa, sugerindo que o diagnóstico e o tratamento precoces das colonizações bacterianas foram eficientes;
- 3- Ocorreu aumento do número de culturas positivas para os principais patógenos a partir do ano de 2010, equivalendo ao 3º ano de acompanhamento do estudo, com posterior queda em 2012, com semelhante comportamento das colonizações entre os 2 grupos estudados;
- 4- *Staphylococcus aureus* foi o primeiro patógeno isolado, em média aos 1,5 anos de idade e apresentou maior ocorrência por paciente na população estudada; *P. aeruginosa* ocorreu na idade de 2,6 anos em 11 (52,3%) da amostra.
- 5- O tempo para inclusão no programa de FC do HC foi em média 2 meses, semelhante aos dados do *Cystic Fibrosis Foundation*;

REFERÊNCIAS

- AKABAS, M.H. Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator. Structure and function of an epithelial chloride channel. **J Biol Chem**, v.6, n. 375, p. 3729-3732, 2000.
- ALMEIDA, M.B.; BUSSAMRA, M.H.C.F.; RODRIGUES, J.C. ABPA diagnosis in Cystic Fibrosis patients: the clinical utility of IgE specific to recombinant *Aspergillus Fumigatus* Allergens. **J Pediatr (Rio J)**, v.82, n.3, 2006.
- ALVAREZ, A.E.; RIBEIRO, A.F.; HESSEL, G.; BERTUZZO, C.S.; RIBEIRO, J.D. Fibrose Cística em um centro de referência no Brasil: características clínicas e laboratoriais de 104 pacientes e sua associação com o genótipo e a gravidade da doença. **J. Pediatr (Rio J)**, v.5, n. 80, p. 371-379, 2004.
- AMOUREUX, L.; BADOR, J.; SIEBOR, E.; TAILLEFUMIER, N.; FANTON, A.; NEUWIRTH, C. Epidemiology and resistance of *Achromobacter xylosoxidans* from Cystic Fibrosis patients in Dijon, Burgundy: First French data. **J Cyst Fibros**, v. 12, p. 170-176, 2013.
- ANDERSEN, D.H. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathologic study. **Am J Dis Child**, n.56, p. 344-399, 1938.
- ARMSTRONG, D.S.; GRIMWOOD, K.; CARZINO, R.; CARLIN, J.B.; OLINSKY, A.; PHELAN, P.D. Bronchoalveolar lavage or oropharyngeal cultures to identify lower respiratory pathogens in infants with cystic fibrosis. **Pediatr Pulmonol**, v. 21, n. 5, p. 267-75, 1996.
- ASNER, S.; WATERS, V.; SOLOMON, M.; YAU, Y.; RICHARDSON, S.E.; GRASEMANN, H., et al. Role of respiratory viruses in pulmonary exacerbations in children with cystic fibrosis. **J Cyst Fibros**, v.11, p. 433-439, 2012.
- BARTH, A.L.; PITT, T.L. Microbial pathogens associated with Cystic Fibrosis: Special focus on *Pseudomonas aeruginosa*. **Braz J Infect Dis**, v.2, n.2, p. 43-61, 1998.
- BERNARDINO, A.L.F.; FERRI, A.; BUENO-PASSOS, M.R.; KIM, C.E.A.; NAKAIE, C.M.A.; GOMES, C.E.T., et al. Molecular analysis in brazilian cystic fibrosis patients reveals five novel mutations, **Genetic Testing**, v.4, n.1, 2000.
- BIEGER, A.M.; MARSON, F.A.L.; BERTUZZO, C.S. Prevalence of $\Delta F508$ mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene among cystic fibrosis patients from a Brazilian referral center. **J Pediatr (Rio J)**, v. 88, n.6, p.531-4, 2012.

BONADIA, L.C.; MARSON, F.A.L.; RIBEIRO, J.D.; PACHOAL, I.A.; PEREIRA, M.C.; RIBEIRO, A.F., et al. CFTR genotype and clinical outcomes of adult patients carried as cystic fibrosis disease. **Gene**, 540, p. 183-190, 2014.

BRADBURY, N.A. Intracellular CFTR: Localization and function. **Physiol Rev**. 79: S175-S191, 1999.

BRAID, S.S.; JOHAL, H.; SKILBECK, K.; STELLER, A.; ALSUBIE, H.; TOVEY, E., et al. Detection of viral and bacterial respiratory pathogens in patients with cystic fibrosis. **J Virol Methods**, v. 182, p. 109-112, 2012.

BRITO, D.A. Perfil Alérgico e Aspergilose Broncopulmonar alérgica em crianças com Fibrose Cística, **J Pediatr (Rio J)**, (no prelo).

BURNS, J.L.; EMERSON, T.; STAPP, J.R.; YIM, D.L.; KEZEWINSKI, J.; LOUDEN, L., et al. Microbiology of sputum from patients at cystic fibrosis centers in the United States. **Clin Infect Dis**, v.27, n. 1, p. 158- 63, 1998.

BURNS, J.L.; GIBSON, R.L.; McNAMARA, S.; YIM, D.; EMERSON, J.; ROSENFELD., et al. Longitudinal assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. **J Infect Dis**, v. 183, n.3, p. 444-52, 2001.

BURNS, J.L.; ROLAIN, J.M. Culture-based diagnostic microbiology in cystic fibrosis: Can we simplify the complexity?. **J Cyst Fibros**, v.13, p.1-9, 2014.

CABELLO, G.M.K. Avanços da Genética na Fibrose Cística. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto, UERJ**, ano 10, 2011.

CAMARGOS, P.A.M.; GUIMARÃES, M.D.C.; REIS, F.J.C. Prognostic aspects of cystic fibrosis in Brazil. **Ann Trop Paediatr**, v. 20, n. 4, p. 287-91, 2000.

CAMPANA, S.; TACCETTI, G.; RAVENNI, N.; MASI, I.; AUDINO, S.; SISI, B., et al. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* complex and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Cystic fibrosis center. **J Cyst Fibros**, v, 3, p. 159-163, 2004.

CARDINES, R.; GIUFRE, M.; POMPILIO, A.; FISCARELLI, E.; RICCIOTTI, G.; BONAVENTURA, G.D. *Haemophilus Influenzae* in children with cystic fibrosis: Antimicrobial susceptibility molecular epidemiology, distribution of adhesins and biofilm formation. **Int J Med Microbiol**, v. 302, p. 45-52, 2012.

CARNEIRO, A.C.C.; LEMOS, A.C.M.; ARRUDA, S.M.; SANTANA, M.A.P.S. Prevalência de aspergilose broncopulmonar alérgica em pacientes com fibrose cística na Bahia, Brasil. **J. Bras Peumol**. V.34, n.11, p. 900-906, 2008.

CASTRO, M.C.S.; FIRMIDA, M.C. O tratamento da fibrose cística e suas complicações. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto**, ano 10, 2011.

CHARK, V.C.B.; SILVEIRA, M.R.; VENDRUSCULO, F.M.; LEITES, G.T.; DONADIO, M.V.F.; PAIM, T.F., et al. Análise descritiva dos pacientes com Fibrose cística em acompanhamento na Unidade de Pneumologia Pediátrica de um Hospital universitário em Porto Alegre- RS. **Sci Med (Porto Alegre)**, PUCRS, v. 16, n. 3, 2006.

CHOTIRMALL, S.H.; BRANAGAN, P.; GUNARATNAM, C.; McELVANEY, N.G. Aspergillus\Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis in an Irish Cystic Fibrosis Population: A Diagnostically Challenging Entity. **Respir Care**, v. 53, n. 8, p. 1035- 1041, 2008.

CIOFU, O.; RIIS, B.; PRESSLER, T.; POULSEN, H.E.; HOUBY, N. Occurrence of Hipermutable *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis patients is Associated with the Oxidative stress caused by Chronic Lung Inflammation. **Antimicrob. Agents Chemother**, v.49, n.6, p. 2276-2282, 2005.

COENYE, T.; VANDAMME, P.; GOVAN, J.R.W.; LIPUMA, J.J. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia complex*. **J Clin Microbiol**, v. 10, n. 39, p. 3427-3436, 2001.

COLLINS, F.S. Cystic Fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. **Science**, 256: 774-779, 1992.

CORREIA,S.; NASCIMENTO, C.; PEREIRA, L.; CUNHA, M.V.; CORREIA, I.S.; BARRETO,C. Infecção respiratória por bactérias do *Complexo da Burkholderia Cepacia*: Evolução clínica em doentes com Fibrose Cística. **Rev Port Pneumol**, v. XIV, n. 1, p. 5-26, 2008.

CROSSLEY, J.R., ELLIOTT, R.B., SMITH, P.A. Dried-blood spot screening for cystic fibrosis in the newborn. **Lancet**, v.3, p. 472-474, 1979.

CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION. **Patient Registry 2001 Annual Data Report**, Behesda, Maryland, USA.

CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION. **Patient Registry 2005 Annual Data Report**, Behesda, Maryland, USA.

CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION. **Patient Registry 2010 Annual Data Report**, Behesda, Maryland, USA.

CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION. **Patient Registry 2012 Annual Data Report**, Bethesda, Maryland, USA.

CYSTIC FIBROSIS TRUST. **Antibiotic Treatment For Cystic Fibrosis**. Kent, UK, 2002.

CYSTIC FIBROSIS TRUST. **Antibiotic Treatment for Cystic Fibrosis**. Report of the UK Cystic Fibrosis trust Antibiotic working Group. 3RD Edition, 2009.

CYSTIC FIBROSIS TRUST. **UK CF Registry Annual Data Report**, 2008.

DALCIN, P.T.R.; SILVA, F.A.A. Fibrose Cística no adulto: aspectos diagnósticos e terapêuticos. **J. Bras. Pneumol**, v. 34, n. 2, p. 107-117, 2008.

DENTINI, P. **Complexo da *Burkholderia Cepacia* em pacientes com Fibrose Cística em um centro de Referência no Brasil: identificação, prevalência e importância clínica**, Dissertação de mestrado, 2010. Faculdade de Ciências médicas da Universidade Estadual de Campinas.

DiSANT'AGNESE, P.A.; DARLING, R.E.; PEREIRA, G.A.; SHEA, A. Abnormal electrolyte composition of sweat in Cystic Fibrosis of the Pancreas. **Pediatrics**, v. 12, p. 549-555, 1999.

DORING, G.; CONWAY, S.P.; HEIJERMAN, H.G.M.; HODSON, M.E.; HOIBY, N.; SMYTH, A.; TOUW, D.J. Antibiotic against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus, **Eur Respir J**, n. 16, p. 749-767, 2000.

DORNELAS, E.C.; FERNANDES, M.I.M.; GALVÃO, L.C.; SILVA, G.A. Estudo do quadro pulmonar do paciente com Fibrose Cística. **J Pediatr (Rio J)**, v.76, n.4, 2000.

DOUGLAS, T.A.; BRENNAN, S.; GARD, S.; BERRY, L.; GANGELL, C.; STICK, S.M. Acquisition and eradication of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. **Eur Respir J**, v. 33, n.2, p.305-33, 2009.

DREVINEK, P. and MAHENTHIRALINGAM, E. *Burkholderia cenocepacia* cystic fibrosis: epidemiology and molecular mechanisms of virulence. **Clin Microbiol Infect**, v. 16, n. 7, 2010.

ETHERINGTON, C.; NASEER, R.; CONWAY, S.P.; WHITAKER, P.; DENTON, M.; PECKHAM, D.G. The role of respiratory viruses in adult patients with cystic fibrosis receiving intravenous antibiotics for a pulmonary exacerbation. **J Cyst Fibros**, v.13, p. 49-55, 2014.

FARIAS, L.; ROSÁRIO FILHO, N.A.; KOVALHUK L.; MIASAKI, N.; CHAVES, S.M.; RECCO, R.A.C., et al. Aspectos clínicos da Fibrose Cística. Experiência no Hospital de Clínicas da UFPR, 1980-1996. **Pediatrics (São Paulo)**, v. 19, n. 4, p. 241- 248. 1997.

FARREL, P.M.; ROSENSTEIN, B.T.; WHITE, T.B.; ACCURSO, F.J.; CASTELLANI, C.; CUTTING, G.R., et al. Guidelines for Diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Report. **J. Pediatr**, v. 153, n. 2, S4-S14, 2008.

FAUCZ, F.R.; GIMENEZ, J.; RAMOS, M.D.; FERRARI, L.P.; ESTEVEL, X.; RASKIN, S. Cystic Fibrosis in a southern brazilian population: characteristics of 90% of the Alleles. **Clin Genet**, v.72, p.218-233, 2007.

FEPE- **Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional**, 2014.

FIRMIDA, M.C.; LOPES, A.J. Aspectos Epidemiológicos da Fibrose cística. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto**, ano 10, 2011.

FITZSIMMONS, S.C. The changing epidemiology of cystic fibrosis. **J Pediatr**, v. 122, n. 1, p. 1-9, 1993.

FOWERAKER, J. Recent advances in the microbiology of respiratory tract infection in cystic fibrosis. **Br Med Bull**, v. 89, p. 93-100, 2009.

GIBSON, L.E.; COOKE, R.E. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. **Pediatric**, v.23, n.3, p.545-9, 1959.

GILLIGAN, P.H. Microbiology of Airway Disease in Patients with Cystic Fibrosis. **Clin Microbiol Rev**, v.1, n. 4, p. 35-51, 1991.

GRIFFITH S, A.J.F.; MILLER JH.; SUZUKI DT.; LEWONTIN RC.; GELBART WM. **An introduction to genetics analysis**. 7th ed. W. H. Freeman Co., 1999.

GUILLOT, L.; BEUCHER, J.; TABARY, O.; ROUZIC, P.L.; CLEMENT, A.; CORVOL, H. Lung disease modifier genes in cystic fibrosis. **Int J Biochem Cell Biol**, 2014.

GOSS, C.H.; BURNS, J.L. Exacerbation in Cystic Fibrosis. 1: Epidemiology and pathogenesis. **Thorax**, v.62, p.360-367, 2007.

GOVAN, J.R.W. & DERETIC, V. Microbial pathogenesis in Cystic Fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. **Microbiol Rev**, v.3, n. 60, p. 539- 574, 1996.

HANSEN, C.R.; PRESSLER, T.; NIELSEN, K.G.; JENSEN, P.O.; BJARNSHOLT, T.; HOIBY, N. Inflammation in *Achromobacter xylosoxidans* infected Cystic Fibrosis patient. **J Cyst Fibros**, v.9, p. 51-58, 2010.

HAUSDORFF, W.; HAJJEH, R.; AL-MAZEOU, A.; SHIBIL, A.; GABARRO, M.S. The epidemiology of *pneumococcal*, *meningococcal*, and *Haemophilus* disease in the Middle East and North Africa (MENA) Region- Current status and needs. **Vaccine**, v.25, p. 1935-1944, 2007.

HEWER, S.C.L.; SMYTH, A.R. Antibiotic Strategies for eradicating *Pseudomonas aeruginosa* in people with cystic fibrosis (Review). **Cochrane Database of Systematic Reviews**, ed.11, 2010.

HOFFMANN, A.; PROCIANOY, E.F.A. Infecção respiratória na Fibrose Cística e Tratamento. **Rev HCPA**, v. 31, n. 2, p.216-223, 2011.

HUDSON, V.L.; WIELINSKI, C.L.; REGELMANN, W.E. Prognostic implications of initial oropharyngeal bacterial flora in patients with cystic fibrosis diagnosed before the age of two years. **J Pediatr**, v. 122, n. 6, p. 854- 60, 1993.

HURT, K.; BITON, D. Cystic Fibrosis. **Medicine**, 40:5, 2012.

JILLING, T.; KIRK, K.L. The biogenesis, traffic, and function of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. **Internal Rev Cytol**, 172: 193-241, 1997.

JOHNSON, L.; OLSEN, J.; SARKADI, B.; BOUCHER, R. Efficiency of gene transfer for restoration of normal airway epithelial function in cystic fibrosis. **Nat Genet**, v. 2, p. 22-25, 1992.

JUBIN, V.; RANQUE, S.; LE BEL, N.S.; SARLES, J.; DUBUS, J.C. Risk factors for *Aspergillus* colonization and Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis in children with Cystic Fibrosis. **Pediatr Pulmonol**, v. 45, p. 764-771, 2010.

KAHL, B.C. Impact of *Staphylococcus aureus* on the pathogenesis of chronic cystic fibrosis lung disease. **Int J Med Microbiol**, v.300, p. 514-519, 2010.

KALIL, M.E.; FERNANDES, A.L.G.; CURZEL, A.C.S.; CORTEZ, M.Z.; LIMA, G.C.G.A. Aspergilose Broncopulmonar Alérgica com imagem radiologica em "dedo de luva". **J Bras Pneumol**, v.32, n.5, p. 472-5, 2006.

KEREM, B.S.; ROMMENS, J.M.; BUCHANAN, J.A.; MARKIEWICZ, D.; COX, T.K.; CHAKRAVARTI, A., et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. **Science**, v.245, p.1073 1080, 1989.

KOLAK, M.; KARPATI, F.; MONSTEIN, H.J.; JANASSON, J. Molecular Typing of the bacterial flora in sputum of Cystic Fibrosis patients. **Int J Med Microbiol**, v.293, p. 309-317, 2003.

KONEMAN, WINN, W.J., et al. **Diagnóstico Microbiológico- Texto e Atlas Colorido- Sexta Edição**. Rio de Janeiro, RJ. Editora: Guanabara Koogan, 2008, p. 316-317.

LEMOS, A.C.M., et al. Fibrose Cística em adultos: aspectos clínicos e espirométricos. **J Bras Pneumol**, v.1, n. 30, p. 9-13, 2004.

LEE, T.W.R.; BROWNLIE, K.G.; GONWAY, S.P.; DENTON, M.; LITTLEWOOD, J.M. Evaluation of a new definition for chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. **J Cyst Fibros**, v.2, p. 29-34, 2003.

LIMA, A.N.; LOPES, A.J.; JANSEN, U.; CAPONE, D.; JANSEN, J.M. Fibrose Cística em adultos: Aspectos clínicos, funcionais e tomográficos. **Pulmão RJ**, v. 13, n. 2, 2004.

LIOU, T.G.; ADLER, F.R.; FITZSIMMONS, S.C.; CAHILL, B.C.; HIBBS, J.R.; MARSHALL, B.C. Predictive 5- Year Survivorship Model of Cystic Fibrosis. **Am J Epidemiol**, v. 153, n. 4, 2001.

LIPUMA, J.J. The changing microbial Epidemiology in Cystic Fibrosis. **Clin Microbiol. Rev.** v. 23, n. 2, 2010.

LIPUMA, J.J.; , SPILKER,T.; GILL, L.H.; CAMPBEL III, P.W.; LIU, L.; MAHENTHIRALINGAM, E. Disrporpotionate distribution of *Burkholderia cepacia* complex species and transmissibility Markers in Cystic Fibrosis. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 164, p 92-96, 2001.

LUISETTI, M. Influence of a secondary genetic factor in Cystic Fibrosis genotype-phenotype correlations. **Monaldi Arch Chest Dis**, v. 52, n. 4, p.390-391, 1997.

LYCZAK, J.B.; CANNON. C.L.; PIER, G.B. Lung infections associated with Cystic Fibrosis. **Clin Microbiol Rev**, v. 15, n. 2, p. 194- 222, 2002.

MACIÁ, M.D.; BLANQUER, D.; TOGOES, B.; SAULEDA, J.; PÉREZ, J.L.; OLIVER, A. Hypermutation Is a Key factor in Development of multiple-Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Strains causing Chronic Lung Infections. **Antimicrob Agents Chemother**, v.49, n.8, p. 3382-3386, 2005.

McMENAMIN, J.D.; ZACCONE, T.M.; COENYE,T.; VANDAMME, P.; LIPUMA, J.J. Misidentification of *Burkholderia Cepacia* in US Cystic Fibrosis treatment Centers an Analysis of, 1,051 Recent Sputum Isolates. **Chest**, v.117, n. 6, p. 1661-1665, 2000.

MAGALHÃES, M.; BRITTO, M.C.A.; BEZERRA, P.G.M.; VERAS, A. Prevalência de bactérias potencialmente patogênicas em espécimes respiratórias de fibrocísticos do Recife. **J Bras Patology Med Lab**, v.40, n. 4, p 223-7, 2004.

MAHENTHIRALINGAM, E.; DREVINEK, P. *Burkholderia cenocepacia* in cystic fibrosis: epidemiology and molecular mechanisms of virulence. **Clin Microbiol Infect**, v.16, n.7, 2010.

MAHENTHIRALINGAM, E.; URBAN, T.A.; GOLDBERG, J.B. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, p.144-56, 2005.

MARKS, M.I. The pathogenesis and treatment of pulmonary infection in patients with cystic fibrosis. **J Pediatr**, v. 98, n. 2, 1981.

MARQUES, E.A. Perfil Microbiológico na Fibrose Cística. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto**, ano 10, 2011.

MARSON,F.A.L.; MARCELINO, A.R.B.; REZENDE,L.M.; RIBEIRO,A.F.; RIBEIRO, J.D.; BERTUZZO, C.S. The IFRD1 (57460>T Polymorphism) gene: A negative Report in Cystic Fibrosis Clinical Severity. **J Mol Genet Med**, v. 7, n.2, 2013.

MARTINS, A.; RIBOLI, D.F.M.; PEREIRA, V.C.; CUNHA, M.L.R.S. Molecular characterization fo Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from a Brazilian University Hospital. **Braz J Infect Dis**, in press, 2014.

MIALL, L.S.; MCGINLEY, N.T.; BROWNLEE, K.G.; CONWAY, S.P. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection in cystic fibrosis. **Arch Dis Child**, v.84, p. 160-162, 2001.

MILLER, M.B.; GILLIGAN, P. H. Laboratory aspects of management of chronic Pulmonary Infections in Patients with Cystic Fibrosis. **J Clin Microbiol**, v. 9, n. 41, p. 4009-4015, 2003.

MISHRA, A.; GREAVES, R.; MASSIE, J. The relevance of sweat testing for the diagnostic of cystic fibrosis in the genomic era. **Clin Biochem Rev**, v. 26, p.135-153, 2005.

MORRAL, N.;LIEVADOT. R.; CASALS .T.; GASPARINI, P.;MACEK, M.; DÖRK, T.; ESTIVILL. X. Independent origins of cystic fibrosis mutations R334W, R347P, R1162X and 3849 10kbCT provide evidence of mutation recurrence in the CFTR gene. **Am J Hum Genet**, 55: 890-898, 1994.

MUHLEBACH, M.S.; MILLER,M.; LA VANGE, L.M.; MAYBEW, G.; GOODRICH, J.S.; MILLER, M.B. Treatment intensity and characteristics of MRSA infection in Cystic Fibrosis. **J Cyst Fibros**, v.10, p. 201-206, 2011.

NETO, N.L. **Fibrose Cística Enfoque Multidisciplinar**. 2º edição Revisada e Ampliada. Secretaria de Estado da Saúde- Estado de Santa Catarina, 2009.

OLIVER, A.; ALARCÓN,T.; CABALLERO,E.; CANTÓN,R. Diagnóstico microbiológico de la colonización-infección broncopulmonar en el paciente con fibrosis quística. **Enferm Infec Microbiol Clin**. v. 27, n.2, p. 89-104, 2009.

OLIVER, A.; CANTÓN, R.;CAMPO, P.; BAQUERO, F.; BLÁZQUEZ, J. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung Infection. **Science**. v. 288, n. 5469, p. 1251-1253, 2000.

PAIXÃO, V.A.; BARROS, T.F.; MOTA, C.M.C.; MOREIRA, T.F.; SANTANA, M.A.; REIS, J.N. Prevalence and antimicrobial susceptibility of respiratory pathogens in patients with cystic fibrosis. **Braz J Infect Dis**, v.14, n. 4, p. 406-409, 2010.

PEREIRA-FERRARI, L. **Influência da lectina ligante de manose (MBL) na expressão clínica da Fibrose Cística pacientes Brasileiros e Canadenses**, Curitiba, 2003. Tese. Universidade Federal do Paraná.

PINHEIRO, M.R.S.; LACERDA, H.R.; MELO, R.G.L.; MACIEL, M.A. *Pseudomonas aeruginosa* Infections: Factores relating to mortality with Emphasis on resistance pattern and Antimicrobial Treatment. **J Infect Dis**, v.12, n. 6, p. 509-515, 2008.

PRETTO, L.; PARIS, F.; MACHADO, A.B.M.P.; MARTINS, A.F.; BARTH, A.L. Genetic similarity of *Burkholderia cenocepacia* from Cystic Fibrosis patients. **Braz J Infect Dis**. v. 17, n.1, p. 86-89, 2013.

RAMSEY, B.W.; DAVIES, J.; McELVANEY, N.G.; TULLIS, E.; BELL, S.C.; DREVINEK, P., et al. A CFTR Potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. **N Engl J Med**, v.365, n.18, p. 1663-1672, 2012.

RASKIN, S. **Estudo multicêntrico das bases da genética molecular e da epidemiologia da fibrose cística em populações brasileiras**. Curitiba, 2001. Tese. Universidade Federal do Paraná.

RASKIN, S.; FERRARI, L.P.; REIS, F.C.; ABREU, F.; MAROSTICA, P.; ROZOV., et al. Incidence of cystic fibrosis in five different states of Brazil as determined by screening of p.F508del, mutation at the CFTR gene in newborns and patients. **J Cyst Fibros**, v. 7, p. 15-22, 2008.

RASKIN, S.; PETAL-ERLER, M.L.; PHILLIPS, J.A.; FERRARI, L.P.; PROBST, C.M.; FAUCZ, F.R., et al. Cystic Fibrosis Gene Variability in Two Southern Brazilian Amerindian Populations: Analysis of the $\Delta F508$ mutation and the KM19 and XV2C Haplotypes. **Human Biology**, v. 79, n.1, p. 79-91, 2007.

RASKIN, S.; PHILLIPS, J.A.; KRISHNAMANI, S.; VNENCAK-JONES, C.; PARKER, R.A.; ROZOV, T., et al. DNA analysis of cystic fibrosis in Brazil by direct PCR amplification from Guthrie cards. **Am J Med Genet**, v. 46, n.6, p. 669-9, 1993.

RATJEN, F., et al. Effect of continuous antistaphylococcal therapy on the rate of *P. aeruginosa* acquisition in patients with cystic fibrosis. **Pediatric Pulmonol**, v. 31, n.1, p. 13-6, 2001.

RATJEN, F.; DORING, G. Cystic fibrosis. **Lancet**, v. 361, n.22, p.681-89, 2003.

RAZVI, S.; QUITTELL, L.; SEWALL, A.; QUINTON, H.; MARSHALL, B.; SAIMAN, L. Respiratory Microbiology of patients with Cystic Fibrosis in the United States, 1995- 2005. **Chest**, v.136, n. 6, p. 1554-1560, 2009.BF

RBFC (**REGISTRO BRASILEIRO DE FIBROSE CÍSTICA**) do grupo Brasileiro de Estudos em fibrose cística, REGISTRO DE DADOS DE AFETADOS, 2010.

REIS, F.J.C.; DAMACENO, N. Fibrose cística. **J Pediatr (Rio J)**, v. 74, n. suplemento 1, p. S76- S94, 1998.

REITER, K.C.; MACHADO, A.B.M.P.; FREITAS, A.L.P.; BARTH, A.L. High Prevalence of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with SCCmecTYPE III in Cystic Fibrosis patients in southern, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 43, n. 4, p. 377-381, 2010.

RIBAS, D.I.R.; SANTOS, W.; MIKAMI, L.R.; RIEDI, C.A.; ROSÁRIO, N.A.; FERRARI, L.P. Mutação G542X é frequente em pacientes com fibrose cística paranaense. **J. Pediatr (Rio J)**, 2014, no prelo.

RIBEIRO, J.D.; RIBEIRO, M.A.G.O.; RIBEIRO, A.F. Controvérsias na fibrose cística- do pediatra ao especialista. **J. Pediatr (Rio J)**, v.78, supl.2, p. 171-186, 2002.

RENDERS, N.; VERBRUGH, H.; BELKUM, A.V.; Dynamics of bacterial colonisation in the respiratory tract of patient with cystic fibrosis. **Infect Genet Evol**, v.1, p. 29-39, 2001.

RIORDAN, J.R.; ROMMENS, J.M.; KEREM, B.; ALON, N.; ROZMAHEL, R.; GRZELCZAK, Z., et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. **Science**, v.2457 p.1066-1073, 1989.

RITZ, N.; AMMAM, R.A.; AEBISCHER, C.C.; SCHOENI, F.; SCHOENI, A.M. Risk factors for Allergic Bronchopulmonary aspergillosis and sensitisation to *Aspergillus Fumigatus* in patient with Cystic Fibrosis. **Eur. J. Pediatr**, v. 164, p. 577-582, 2005.

RODRIGUES, R.; GABETTA, C.S.; PEDRO, K.P.; VALDERATO, F.; FERNANDES, M.I.M.; MAGALHÃES, P.K.R., et al. Cystic Fibrosis and neonatal screening. **Cad Saúde Pública, R.J**, v. 24, sup.4: S475- S484, 2008.

ROMAN, F. et al. Dynamics of long-term colonization of respiratory tract by *Haemophilus influenzae* in Cystic Fibrosis patients shows a marked increase in hypermutable strains. **J Clin Microbiol**, v.1, n. 42, p. 1450- 1459, 2004.

ROMMENS, J.M.; IANNUZZI, M.C.; KEREM, B.; DRUMM, M.L.; MELMER, G.; DEAN, M., et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. **Science**, v.245, p.1059-1065, 1989.

ROSÁRIO, N.A.; RIEIDI, C.A. Cystic Fibrosis and atopy. **Allergol Immunopathol**, p. 137-9, 2013.

ROSENSTEIN, B.J.; CUTTING, G.R. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis foundation Consensus Panel. **J Pediatr**, v. 132, n.4, p.589-95, 1998.

ROVEDDER, P.M.E.; ZIEGLER, B.; PASIN, L.R.; PINOTTI, A.F.F.; BARRETO, S.S.M.; DALCIN, P.T.R. Infecção bacteriana crônica e indicadores ecocardiográficos de Hipertensão Pulmonar em pacientes com Fibrose Cística. **J Bras Pneumol**, v.34, n. 7, p. 461-467, 2008.

SAIMAN, L.; CHEN, Y.; TABIBI, S.; GABRIEL, P.S.; ZHOU, J.; LIU, Z., et al. Identification and antimicrobial susceptibility of *Alcaligenes xylosoxidans* isolated from patients with Cystic Fibrosis. **J Clin Microbiol**, v.39, n.11, p.3942 -3945, 2001.

SAIMAN, L.; SIEGEL, J. Infection Control in Cystic Fibrosis. **Clin Microbiol Rev**, v. 1, n. 17, p. 57-71, 2004.

SANTANA, M.A., et al. Prevalence of pathogens in cystic fibrosis patients in Bahia, Brazil. **Braz J Infec Dis**, n.7, p. 69-72, 2003.

SANTOS, C.S.S.; RIBEIRO, J.D.; RIBEIRO, A.F.; HESSEL, G. Análise crítica dos escores de avaliação de gravidade da fibrose cística: Estado da Arte. **J Bras Pneumol**, v.30, n.3, 2004.

SANTOS, G.P.C.; DOMINGOS, M.T.; WITTIG, E.O.; RIEDI, C.A.; ROSÁRIO, N.A. Programa de triagem neonatal para Fibrose Cística no estado do Paraná: avaliação após 30 meses de sua implantação. **J Pediatr (Rio J)**, v.81, n.3, p.240- 244, 2005.

SCHWIEBERT, E.M.; BENOS, D.J.; EGAN, M.E.; STUTIS, J.; GUGGINO, B. CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. **Physiol Rev**, v. 79, n. 1, 1999.

SIMS, E.J.; McCORMICK, J.; MRCPCH.; MEHTA, G.; PHILL, M.; MEHTA, A. Neonatal Screening For Cystic Fibrosis is Beneficial even in the context of modern treatment. **J Pediatr**, v. 147, p. S42-S46, 2005.

SMITH, D.L.; GUMERY, L.B.; SMITH, E.G.; STABLEFORTH, D.E.; KAUFMANN, M.E.; PITT, T.L. Epidemic of *Pseudomonas cepacia* in an Adult Cystic Fibrosis Unit: Evidence of Person-to Person transmission. **J Clin Microbiol**, v. 31, n. 11, p. 3017-3022, 1993.

SOUTHERN, K.M.; MÉRELLE, M.M.E.; DANKERT-ROELSE, J.E.; NAGELKERKE, A. Newborn screening for cystic fibrosis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, Issue 1, 2009.

SOUZA, H.A.P.H.M.; NOGUEIRA, K.S.; MATOS, A.P.; VIEIRA, R.P.; RIEDI, C.A.; ROSÁRIO, N.A. Early microbial colonization of cystic fibrosis patients identified by neonatal screening, with emphasis on *Staphylococcus aureus*. **J Pediatr (Rio J)**, v.82, n.5, p.377-382, 2006.

SPEERT, D.P.; HENRY, D.; VANDAMME, P.; COREY, M.; MAHENTHIRALINGAM, E. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex in patients with cystic fibrosis Canadá. **Emerg Infect Dis**, v.8, n.2, 2002.

SPIPKER, J.; VANDAMME, P.; LIPUMA, J.J. Identification and distribution of *Achromobacter* species in cystic fibrosis. **J Cyst Fibros**, v.12, p. 298-301, 2013.

STERN, R.C.; BOAT, T.F.; ABRAMOWSKI, C.R.; MATTHEWS, L.W.; WOOD, R.E.; DOERSHUK, C.F. Intermediate-range sweat chloride concentration and *Pseudomonas* bronchitis. A cystic fibrosis variant with presentation of exocrine pancreatic function. **JAMA**, v. 239, n. 25, p. 2676-2680, 1978.

STEVENS, D.A.; MOSS, R.B.; KURUP, V.P.; KNUTSEN, A.P.; GREENBERGER, P.; JUDSON, M.A., et al. Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis in Cystic Fibrosis – State of the Art: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference. **Clin Infect Dis**, supp3: S225-64, 2003.

STRAUSBAUG, S.D.; DAVIS, P.B. Cystic Fibrosis: A review of epidemiology and pathobiology. **Clin Chest Med**, v. 28, p.279- 288, 2007.

SULLIVAN, B.P.O.; FREEDMAN, S.D. Cystic Fibrosis. **Lancet**, v.343, p. 1981-904, 2009.

TABLAN, O.C.; CARSON, L.A.; CUSICK, L.B.; BLAND, L.A.; MARTONE, W.J.; JARVIS, W.R. Laboratory proficiency test results on use of selective media for isolating *Pseudomonas cepacia* from simulated sputum specimens of patients with cystic fibrosis. **J Clin Microbiol**, v.25, n.3, p. 485-487, 1987.

TAUSSIG, L.M.; Cystic Fibrosis. In: TAUSSIG, L.M. (ed). **Cystic Fibrosis**. New York, Thieme-Stratton, p. 1-9, 1984.

TIZZANO EF, BUCHWALD M. Cystic Fibrosis: Beyond the gene to therapy. **J. Pediatr**, 120(3):337-349, 1992.

THOMASSEN, M.J.; DEMKO, C.A.; DOERSHUK, C.F.; STERN, R.C.; KLINGER, J.D. *Pseudomonas cepacia*: decrease in colonization in patients with cystic fibrosis. **Am Rev Respir Dis**, v. 134, n. 4, p. 669-671, 1986.

THOMASSEN, M.J. et al. Cultures of thoracotomy specimens confirm usefulness of sputum cultures in cystic fibrosis. **J Pediatr**, v. 104, n.3, p.352-6, 1984.

TORO, M.D.D.; BAÑO, J.R.; MATINEZ, L.M.; PASCUAL, A.; CANO, R.P.; PEREA, E.J., et al. Características epidemiológicas, clínicas y pronósticas de la infección por *Stenotrophomonas maltophilia*. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 24, n. 1, p. 4-9, 2006.

TSUI, L.C. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. **Am J Respir Crit Care Med**, n.151, p. 47-53, 1995.

ULANOVA, M.; TSANG, R.S.W. Invasive *Haemophilus influenzae* disease: Changing epidemiology and host-parasite interactions in the 21st century. **Infect Genet Evol**, v.9, p.594-605, 2009.

VANDERHELST, E.; MEIRLEIR, L.D.; VERBANCK, S.; PIÉRARD, D.; VINCKEN, W.; MALFROOT, A. Prevalence and impact on FEV1 decline of chronic Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) colonization in patients Cystic Fibrosis A single- center caso control study of 165 patients. **J Cyst Fibros**, v. 11, p. 2-7, 2012.

WATERS, D.L.; WILCKEN, B.; IRWIG, L.; ASPEREN, P.V.; MELLIS, C.; SIMPSON, J.M., et al. Clinical outcomes of newborn screening for Cystic Fibrosis. **Arch Dis Child Fetal Neonatal**, v.80, F1-F7, 1999.

WELSH, M.J.; TSUI, L.C.; BOAT, T.F.; BEAUDET, A.C. Cystic Fibrosis. In: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLE, D. **The metabolic and**

molecular bases of inherited disease. 7. Ed. New Yourk: McGraw-Hill, 3:3799-3876, 1995.

WEST, S.E.H.; ZENG, L.; LEE, B.L.; KOSOROK, M.R.; LAXONA, A.; ROCHA, M.J., et al. Respiratory Infect with *Pseudomonas aeruginosa* in children with Cystic Fibrosis. **JAMA**, v. 287, n. 22, p. 2958-2967, 2002.

WHITEFORD, M.L.; WILKNSON, J.D.; McCOLL, J.H.; CONLON, F.M.; MICHIE, J.R.; EVANS, T.J., et al. Outcome of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* colonisation in children with cystic fibrosis following a hospital outbreak. **Thorax**, v. 50, p. 1194-8, 1995.

WONG, K.; ROBERTS, M.C.; OWENS, L.; et al. Selective media for the quantitation of bacteria in Cystic Fibrosis sputum. **J Med Microbiol**, n. 17, p. 113-119, 1984.

WRIGHT, S.W. e MORTON, N.E. Genetic studies on cystic fibrosis in Hawai. **Am J Hum Genet**, 20: 157-169, 1968.

APÊNDICE

GRÁFICO 1-

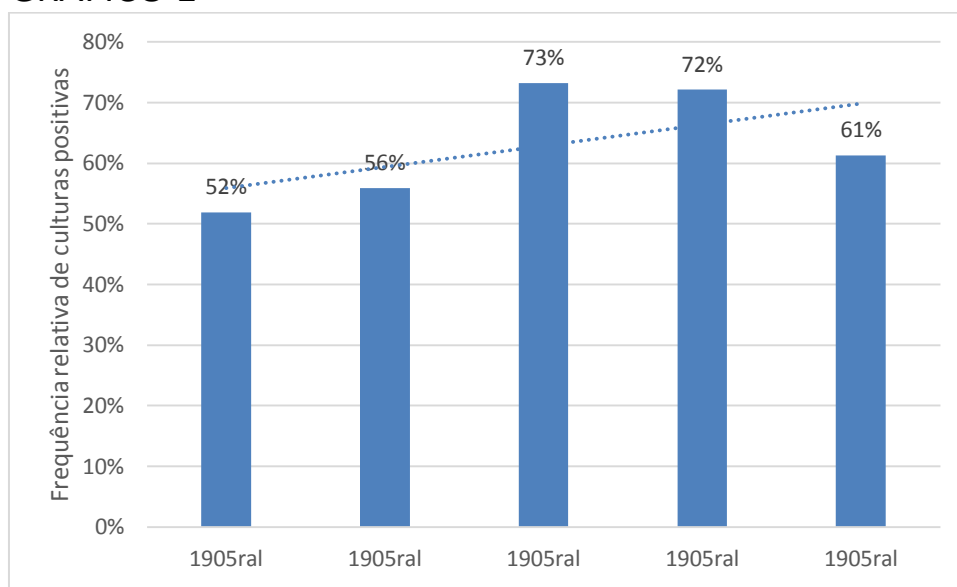


Gráfico 1– Frequência relativa de culturas positivas de patógenos entre os pacientes cadastrados no ambulatório de Fibrose Cística do HC-UFPR, n=62.

GRÁFICO 2-

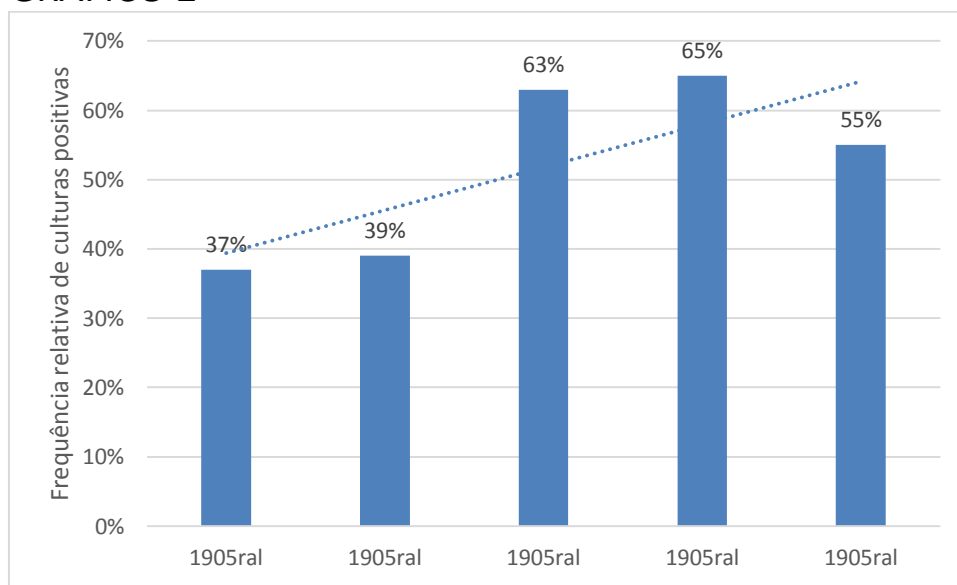


Gráfico 2–Frequência relativa de culturas positivas de patógenos entre os pacientes cadastrados no ambulatório de Fibrose Cística do HC-UFPR, n=21.

GRÁFICO 3-

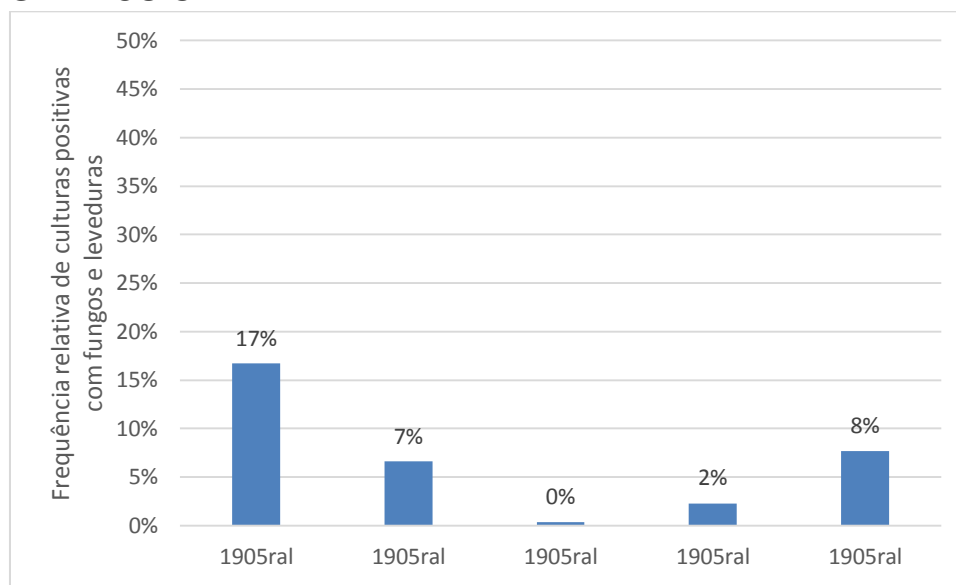


Gráfico 3—Frequência relativa de culturas positivas de Fungos em função dos anos de monitoramento entre os pacientes cadastrados no ambulatório de Fibrose Cística do HC-UFPR, n=62.

GRÁFICO 4-

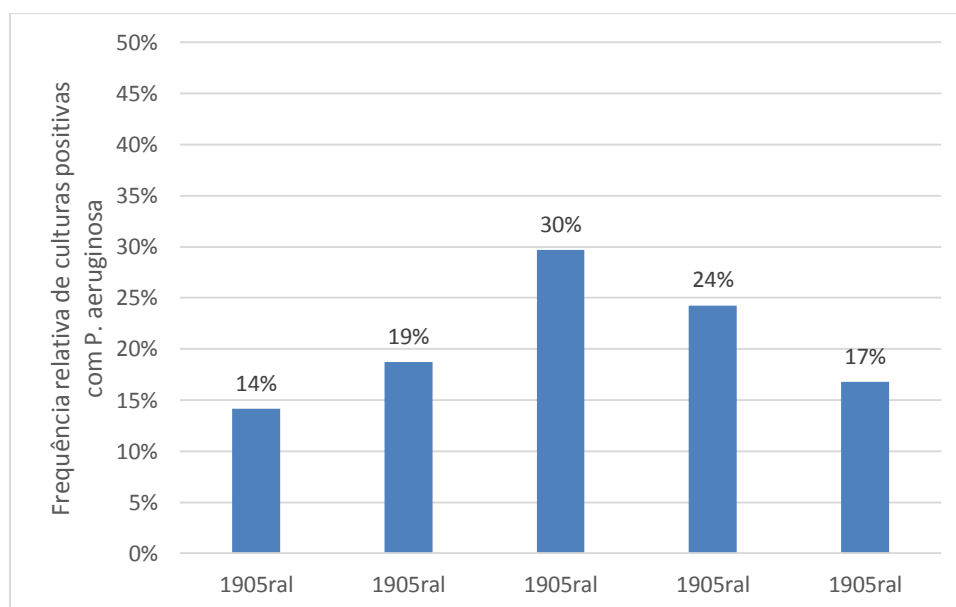


Gráfico 4—Frequência relativa de culturas positivas de *P. aeruginosa* em função dos anos de monitoramento entre os pacientes cadastrados no ambulatório de Fibrose Cística do HC-UFPR, n= 62.

GRÁFICO 5-

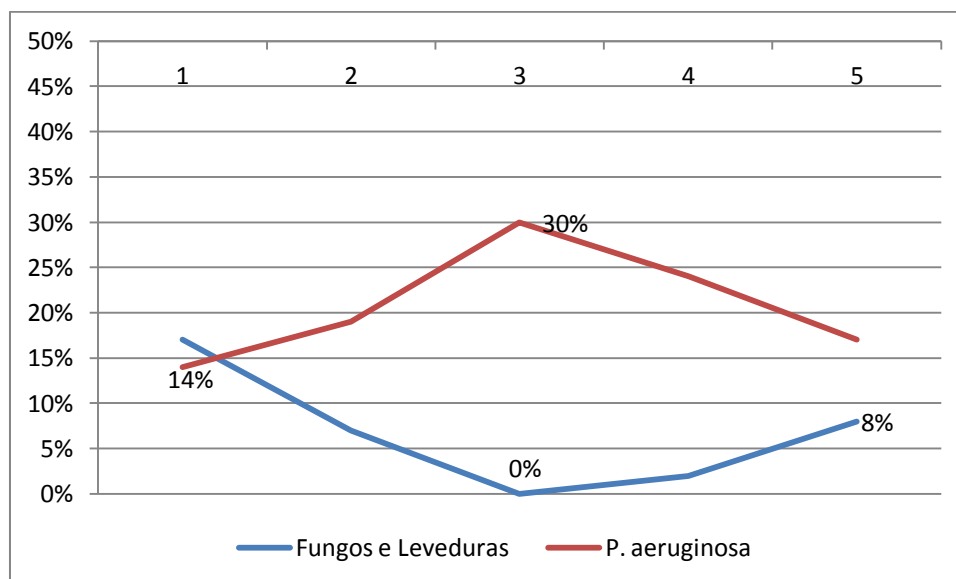


Gráfico 5- Correlação da frequência relativa de culturas positivas para Fungos, *P. aeruginosa*, n=62.

GRÁFICO 6-

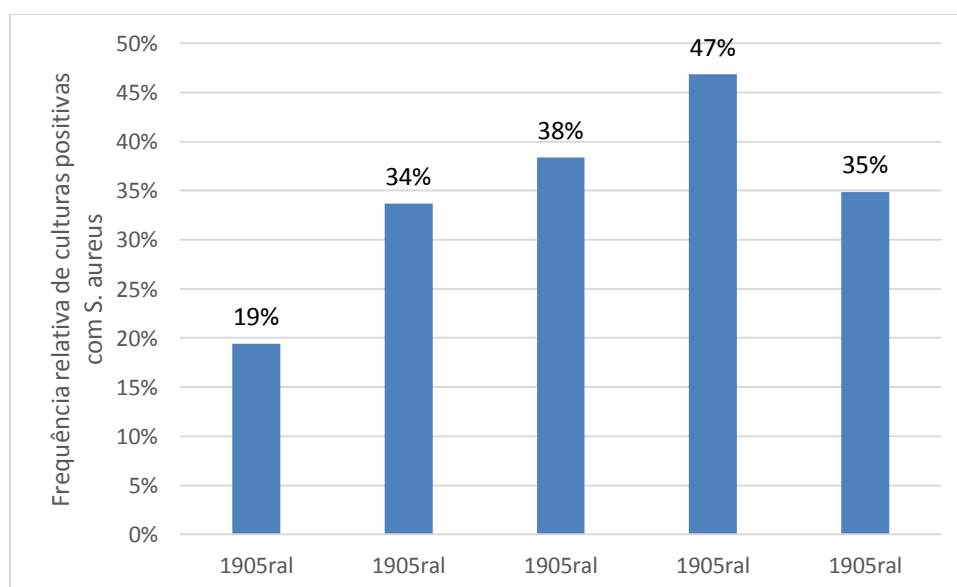


Gráfico 6–Frequência relativa de culturas positivas de *S. aureus* sem função dos anos de monitoramento entre os pacientes cadastrados no ambulatório de Fibrose Cística do HC-UFPR, n=62.

GRÁFICO 7-

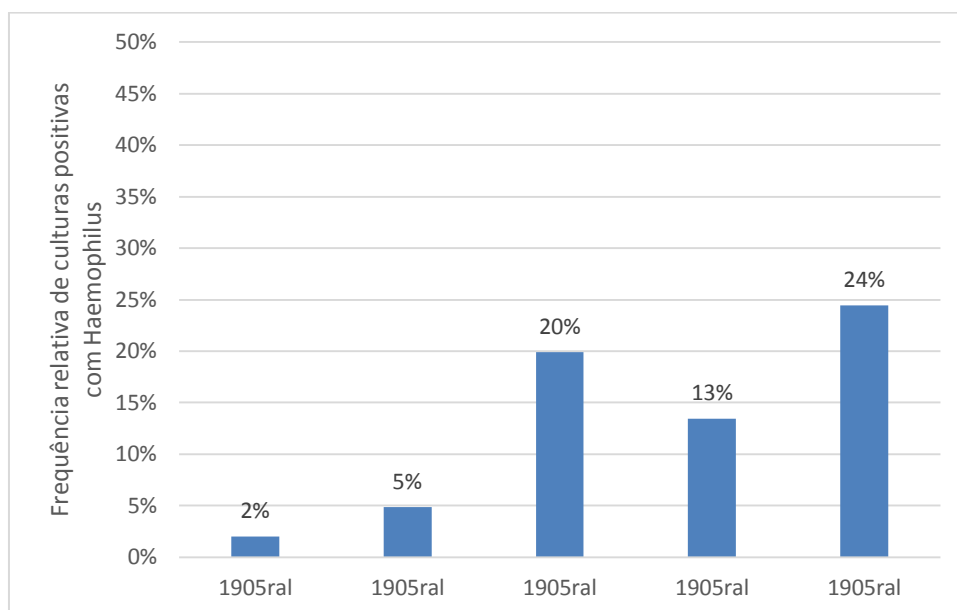


Gráfico 7 – Frequência relativa de culturas positiva de *Haemophilus* sp. em função dos anos de monitoramento entre os pacientes cadastrados no ambulatório de Fibrose Cística do HC-UFPR, n=62.

GRÁFICO 8-

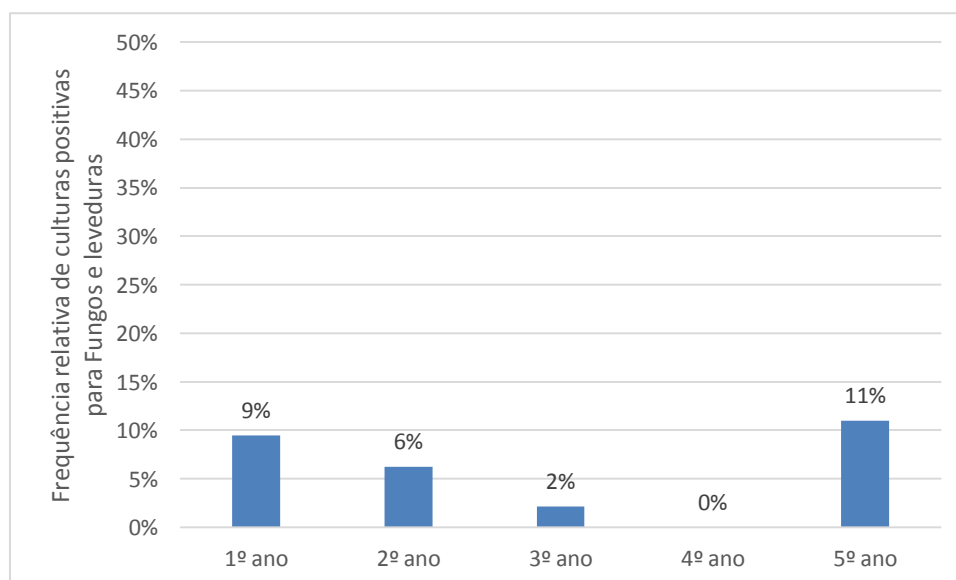


Gráfico 8– Frequência relativa de culturas positivas de Fungos em uma avaliação longitudinal de 21 pacientes nascidos em 2008/2009 e acompanhados pelo ambulatório de Fibrose Cística do HC-UFPR.

GRÁFICO 9-

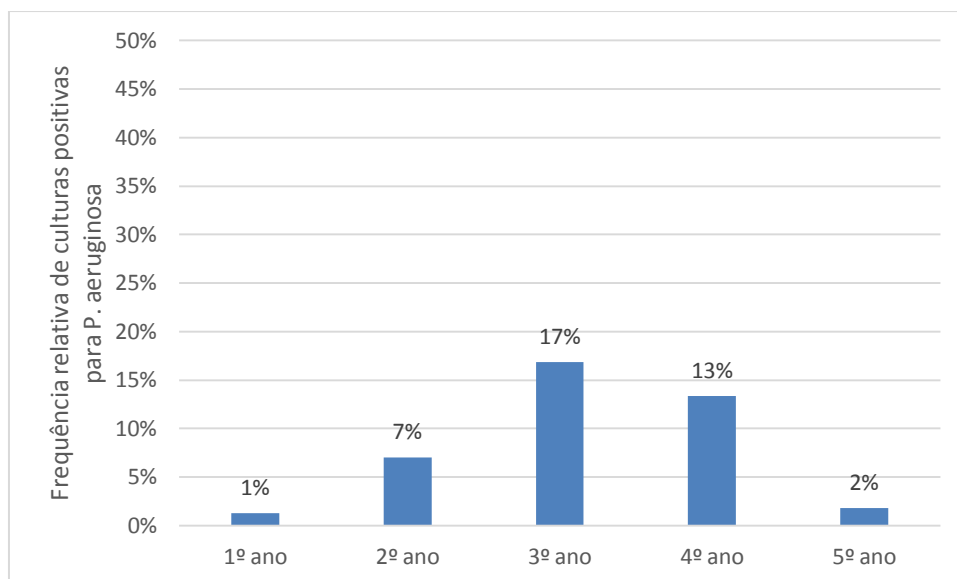


Gráfico 9 – Frequência relativa de culturas positivas de *P. aeruginosa* em uma avaliação longitudinal de 21 pacientes nascidos em 2008/2009 e acompanhados pelo ambulatório de Fibrose Cística do HC-UFPR.

GRÁFICO 10-

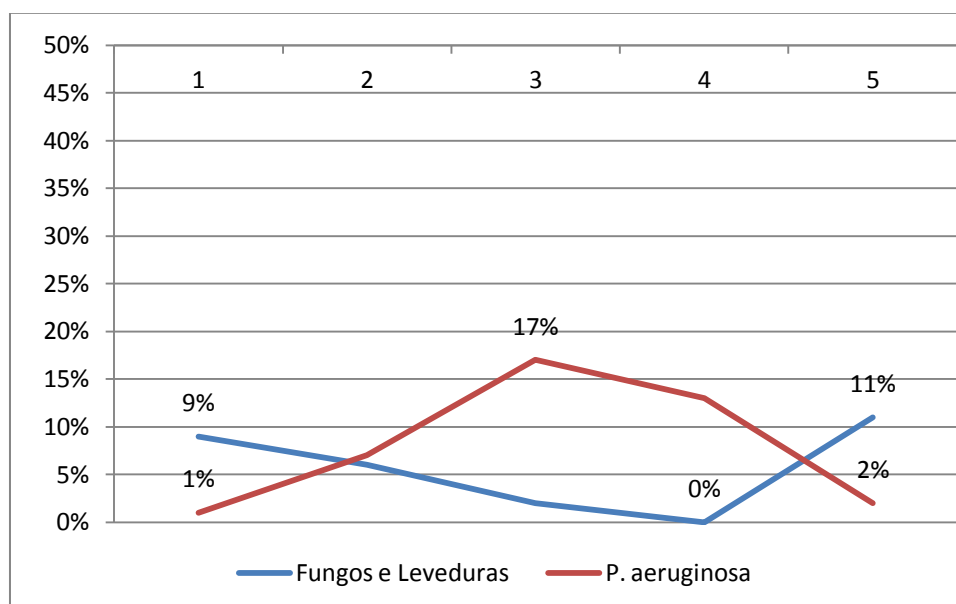


Gráfico 10- Correlação da frequência relativa de culturas positivas para Fungos e *P. aeruginosa*, n=21.

GRÁFICO 11-

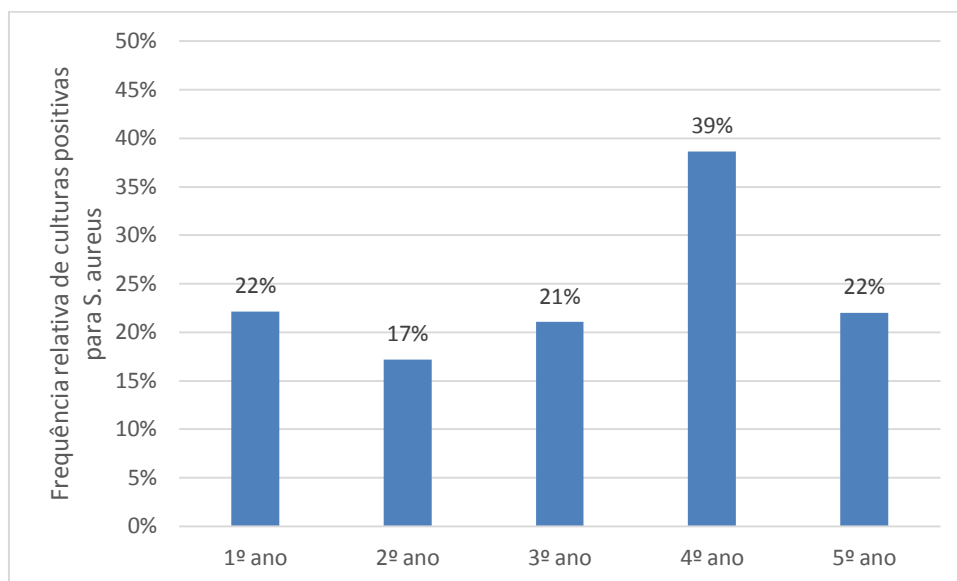


Gráfico 11 – Frequência relativa de culturas positivas de *S. aureus* em uma avaliação longitudinal de 21 pacientes nascidos em 2008/2009 e acompanhados pelo ambulatório de Fibrose Cística do HC-UFPR.

GRÁFICO 12-

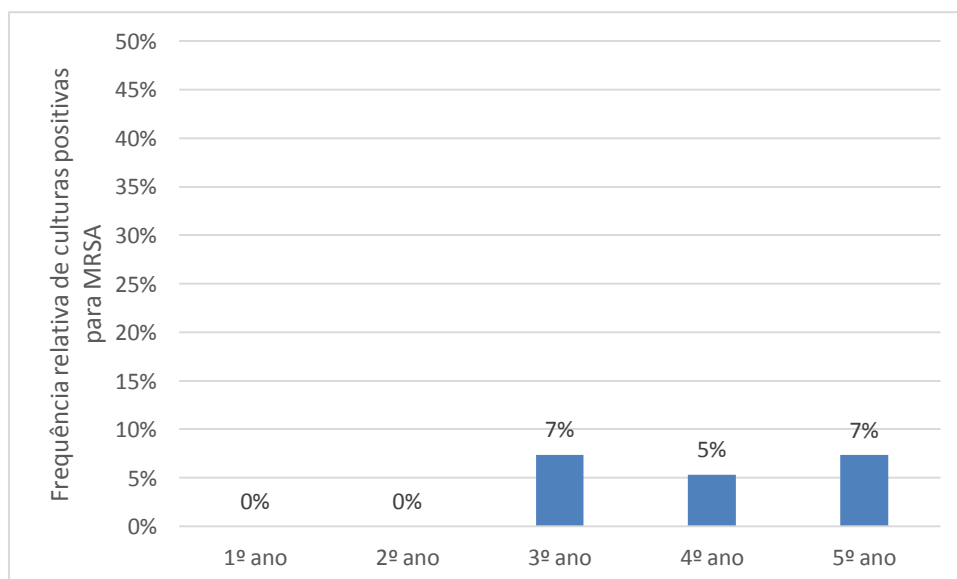


Gráfico 12 – Frequência relativa de culturas positivas de MRSA em uma avaliação longitudinal de 21 pacientes nascidos em 2008/2009 e acompanhados pelo ambulatório de Fibrose Cística do HC-UFPR.

GRÁFICO 13-

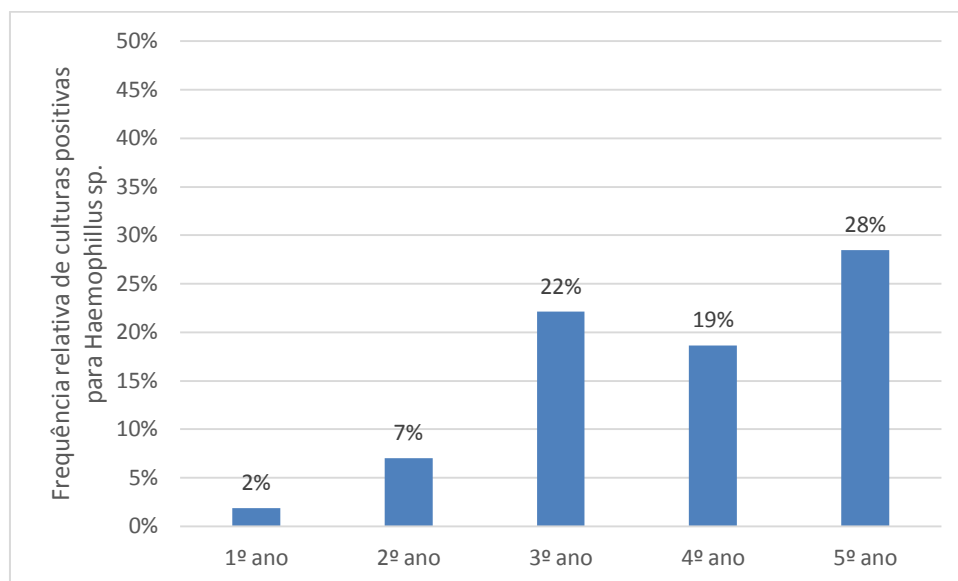


Gráfico 13 – Frequência relativa de culturas positivas de *Haemophilus* sp. em uma avaliação longitudinal de 21 pacientes nascidos em 2008/2009 e acompanhados pelo ambulatório de Fibrose Cística do HC-UFPR.

Tabela 1-

N= com CBC	ANO	CBC %	CB+Staphy %	CB+ MRSA %	CB+ Pseudo	CB+ Sphingo	total de culturas
9	2008	2 (8%)	13 (52%)	3 (12%)	5 (20%)	2 (8%)	25
11	2009	6 (27,27%)	7 (31,81%)	5 (22,72%)	4 (18,18%)		22
15	2010	3 (10,71%)	8 (28,57%)	7 (25%)	10 (35,71%)		28
11	2011	10 (29,41%)	7 (20,58%)	8 (23,52%)	9 (26,47%)		34
8	2012	3 (17,64%)	7 (41,17%)	5 (29,41%)	1 (5,88%)	haem 5,88%	17

126 CULTURAS

Tabela 1 – Frequência relativa de culturas positivas para CBC, isoladas e associadas a *S. aureus*, MRSA, *P. aeruginosa*, *Sphingomonas*.

ANEXO



Curitiba, 17 de fevereiro de 2011.

Ilmo (a) Sr. (a)
Lilian Pereira Ferrari
Neste

Prezada Pesquisadora:

Comunicamos que a **Emenda do Protocolo; Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão janeiro/2011 e Termo de Assentimento Livre e Esclarecido versão janeiro/2011**, referente ao Projeto de Pesquisa intitulado “CARACTERIZAÇÃO DAS VARIANTES GENÔMICAS DO COMPLEXO DA BURKHOLDERIA CEPACIA EM APCIENTES COM FIBROSE CÍSTICA DO ESTADO DO PARANÁ”, foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em 17 de fevereiro de 2011. O referido documento atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96, e complementares, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Ministério da Saúde.

CAAE: 0198.0.208.000-10

Registro CEP: 2290.184/2010-07

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Renato Tambara Filho'.

Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR